

Universidad Pública de Navarra

***Nafarroako
Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**CONSERVACIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS LÁCTEOS MEDIANTE
ATOMIZACIÓN Y LIOFILIZACIÓN**

presentado por

ANDREA TRES INSAUSTI

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Junio, 2018

RESUMEN

Los concentrados proteicos lácteos (CPL), debido a las propiedades funcionales de las proteínas y a su valor general, se comercializan ampliamente y están muy presentes en la industria alimentaria (nutrición infantil, elaboración de quesos y yogures...). El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de técnicas de secado, concretamente la atomización y la liofilización, sobre las características de un CPL. Se realizó una atomización (temperatura del aire de entrada 160°C) y dos liofilizaciones con tiempo de secado primario diferente (23 y 8 horas). Se ha determinado el efecto de estos tratamientos sobre el CPL mediante el color, la actividad de agua, el índice de dispersión, el índice de solubilidad, el tamaño de partícula y la estabilidad física). Los resultados principales indican que el color de las muestras tratadas es más cercano al color de la leche y que los índices de dispersión y solubilidad aumentan por encima del 80%.

Palabras clave: Concentrado proteico lácteo, caseína micelar, atomización, liofilización y métodos de reconstitución.

ABSTRACT

Milk protein concentrates (CPL), due to properties of their functional proteins and their general value, are widely commercialized and available in the food industry (child nutrition, cheese and yogurt production...). The aim of this work is to study the effect of drying techniques, specifically spray and freeze-drying, on CPL characteristics. The next trials were carried out: one spray drying process (inlet temperature of 160°C) and two and two freeze-drying varying the duration of primary drying process (23 and 8 hours long). The effect of these treatments on CPL characteristics (colour, water activity, dispersion and solubility index, particle size and physical stability) were determined. The main results show that the colour of treated samples is closer to milk one and the dispersibility and solubility are increased above 80%.

Key words: milk protein concentrate, micellar casein, spray-drying, freeze-drying, reconstitution methods.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LECHE	1
1.2 LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	2
1.2.1 Proteínas séricas	2
1.2.2 Caseínas	3
1.2.3 Obtención de caseína y proteínas del suero de la leche	8
1.3 CONCENTRADOS PROTÉICOS	8
1.4 ATOMIZACIÓN Y LIOFILIZACIÓN	9
1.5 REHIDRATACIÓN DE LOS POLVOS LÁCTEOS	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 RECONSTITUCIÓN DE LA CASEÍNA MICELAR	16
3.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	17
3.2.1 pH.....	17
3.2.2 Color.....	17
3.2.3 Estabilidad física	17
3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	18
3.4 ATOMIZACIÓN	21
3.5 LIOFILIZACIÓN.....	21
3.6 MÉTODOS DE RECONSTITUCIÓN	22
3.6.1 Color.....	22
3.6.2 Actividad de agua.....	22
3.6.3 Índice de dispersión	22
3.6.4 Índice de solubilidad	23
3.6.5 Tamaño de partícula.....	23
3.6.6 Estabilidad física	23
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
3.8 PLAN EXPERIMENTAL.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO INICIAL.....	25
4.2 EFECTO DE LA ATOMIZACIÓN Y LA LIOFILIZACIÓN SOBRE UNA CASEÍNA MICELAR CONOCIDA (Prodiel 87B)	27
4.2.1 <i>Aspecto</i>	27
4.2.2 <i>Color</i>	28
4.2.3 <i>Actividad de agua</i>	30
4.2.4 <i>Tamaño de partícula</i>	31
4.2.5 <i>Índice de dispersión</i>	32
4.2.6 <i>Índice de solubilidad</i>	33
4.2.7 <i>Estabilidad física</i>	34
5. CONCLUSIONES	37
6. PERSPECTIVAS	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO I	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura coloidal de la leche (Araneda, 2018).....	2
Figura 2. Modelo de micela según el modelo de submicelas (Ferrandini, Castillo, López, & Laencina, 2006).....	5
Figura 3. Micela de caseína según el modelo de Horne (1998).....	6
Figura 4. Puente de calcio entre dos fosfoproteínas (Calvo, s. f.).....	6
Figura 5. (a) Variación de la humedad con el tiempo. (b) Evolución de la temperatura de la gota durante el secado (Mondragón et al., 2013).....	10
Figura 6. Etapas del proceso de liofilización (Orrego Alzate, 2008).....	12
Figura 7. Representación esquemática del perfil de rehidratación para un polvo lácteo aglomerado con alto contenido proteínico, que muestra 1 humectación (wetting), 2 hinchazón (swelling), 3 hundimiento (sinking), 4 dispersión (dispersión) y 5 disolución (dissolution) (Crowley et al., 2016).....	13
Figura 8. Muestra en el ultrasonidos.....	16
Figura 9. Sistema CIELAB.....	17
Figura 10. Turbiscan Lab Formulation Smart Scientific.....	18
Figura 11. Sembrador automático Eddy Jet 2 (IUL, España).....	19
Figura 12. Sectores para el recuento microbiológico con sembradora automática.....	20
Figura 13. Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Flawil, Suiza).....	21
Figura 14. Liofilizador Lyobeta 25 (Telstar, España).....	21
Figura 15. Medidor de actividad de agua (Aw).....	22
Figura 16. Tamiz de 200 micras (Restch GmbH®, Alemania).....	22
Figura 17. Desarrollo microbiano en la reconstitución micelar al 8% (* menso de 1 Log UFC/ml).....	26
Figura 18. Concentrado proteico control, atomizado, liofilizado 1 y liofilizado 2 (de izq a drch).....	27
Figura 19. Coordenada L* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).....	28
Figura 20. Coordenada a* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).....	28
Figura 21. Coordenada b* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).....	29
Figura 22. Actividad del agua la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2.....	30

Figura 23. Tamaño de partícula de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).	31
Figura 24. Índice de dispersión de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).	32
Figura 25. Índice de solubilidad de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).	33
Figura 26. Incremento de la transmisión (ΔT) y de retrodispersión (ΔBS) del producto inicial.	35
Figura 27. Gráfico de la estabilidad física del producto de liofilización 2.	35
Figura 28. Estabilidad física de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización 1 y liofilización 2.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la leche de vaca (por cada 100 gramos).	1
Tabla 2. Comparación de las propiedades claves de las caseínas y las proteínas del suero lácteo (Fox, 2008).	7
Tabla 3. Principales características de Prodiel 87B.	16
Tabla 4. Temperatura, tiempo y ubicación de la incubación de cada microorganismo.	19
Tabla 5. Condiciones atomización.	24
Tabla 6. Condiciones liofilización.	24
Tabla 7. Análisis físico-químico de la reconstitución de caseína micelar al 8% (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).	25
Tabla 8. Tipos de desestabilización física.	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LECHE

La leche es un fluido complejo que contiene varios cientos de especies moleculares. Los principales constituyentes son agua, lípidos, azúcar (lactosa) y proteínas. Además, hay numerosos constituyentes menores, principalmente en niveles traza, como minerales, vitaminas, hormonas, enzimas y compuestos misceláneos (Thompson et al., 2009).

El hombre ha usado leche en su dieta durante aproximadamente 8000 años y se ha desarrollado una importante industria en torno al procesamiento de leche de algunas especies para alimentos humanos, especialmente leche de ganado bovino, búfalo, oveja y cabra. La leche de origen vacuno presenta la composición indicada en la siguiente tabla.

Tabla 1. Composición de la leche de vaca (por cada 100 gramos).

Nutriente	Vaca
Agua (g)	88,0
Lactosa (g)	4,7
Grasa (g)	3,4
Proteína (g).	3,2
Minerales (g).	0,72

La composición varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores. Aún así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables (Fox, 2008).

La lactosa es el componente más abundante del extracto sólido. Es un hidrato de carbono que se encuentra solamente en la leche y es el responsable del sabor dulce de ésta. Además de la lactosa, se ha encontrado una gran cantidad de otros sacáridos libres en la leche, cuyas concentraciones, proporciones y tipos muestran grandes diferencias entre las especies como son los oligosacáridos. La síntesis de lactosa atrae agua osmóticamente hacia las vesículas de Golgi y, por lo tanto, afecta el volumen de leche y la concentración de caseína que se empaqueta en las vesículas de Golgi. Existe una correlación inversa entre las concentraciones de lactosa y caseína en la leche (Jenness & Holt, 1987).

Los lípidos son el segundo componente mayoritario y es el más variable. Se encuentran en forma de glóbulos grasos y son principalmente ácidos grasos saturados (aprox., 67%). Poseen una proporción apreciable de ácidos grasos de cadena corta que le proporcionan el olor característico a la leche y derivados.

Las proteínas se encuentran en cantidades apreciables variando de 3,0 a 4,0% (p/v) y se pueden distinguir las proteínas del suero y las caseínas.

Las vitaminas se encuentran en cantidades muy pequeñas, pero desempeñan un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y funcionamiento del cuerpo humano, ya que la leche contiene todas las vitaminas en cantidades suficientes para permitir el mantenimiento normal y el crecimiento del neonato. En concreto, la leche de vaca es una fuente muy importante de vitaminas, especialmente biotina (B7), riboflavina (B2) y cobalamina (B12), en la dieta humana.

Los minerales representan una pequeña parte de los constituyentes de la leche (1%), sin embargo, tienen un indiscutible valor nutricional y tienen una enorme importancia en el mantenimiento de la estabilidad de la leche.

Además la leche contiene diversos enzimas (proteínas activas), algunas con actividad antimicrobiana, anticuerpos, células macrofágicas con una misión defensiva, hormonas propias del animal (Jeness & Holt, 1987).

Los componentes de la leche se encuentran en partículas coloidales dispersas en tres rangos de tamaño (Figura 1):

- Proteínas de suero disueltas a nivel molecular.
- Caseínas dispersas como grandes agregados (50 - 500 nm) coloidales (micelas).
- Lípidos emulsionados como glóbulos grandes (1 - 20 μm).

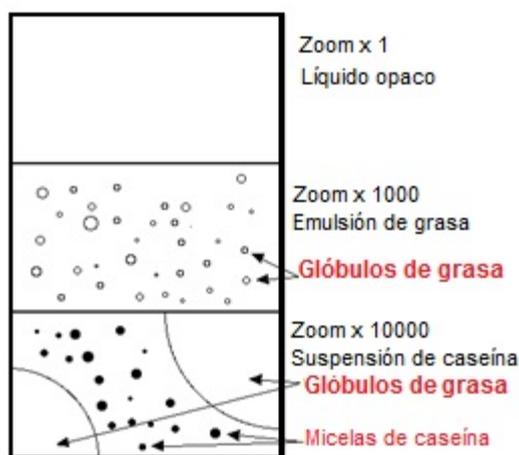


Figura 1. Estructura coloidal de la leche (Araneda, 2018).

1.2 LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

Las propiedades de la leche y la mayoría de los productos lácteos se ven más afectadas por las proteínas que contienen que por cualquier otro componente. Las proteínas de la leche también tienen muchas propiedades únicas; debido a esto y su importancia tecnológica, se han estudiado extensamente y son probablemente el sistema de proteína de alimento mejor caracterizado.

La investigación sobre las proteínas de la leche data de principios del siglo XIX. Tras años de investigación, en 1938 Mulder describió un método para la preparación de proteínas a partir de leche mediante precipitación ácida. La proteína precipitada con ácido se denominó caseína, el suero líquido restante que quedó después de la precipitación isoelectrica de caseína de leche es una solución diluida de proteínas conocida como proteínas séricas. Además de las caseínas y las proteínas del suero (proteínas séricas), la leche contiene otras fuentes de nitrógeno como son las peptonas proteicas (PP) y el nitrógeno no proteico o NPN (Fox, 2008).

1.2.1 Proteínas séricas

Las proteínas de suero son aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche bovina. Se caracterizan por ser compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14×10^3 y 10^6 Daltons, y por ser solubles en un amplio intervalo de pH (Kilara & Vaghela, 2018).

Las principales proteínas séricas son:

- β - lactoglobulina: que representa el 50% de las proteínas del suero y el 12% de la proteína total en la leche bovina. Es una proteína globular típica formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de unos $18,4 \times 10^3$ Da. Existen varias variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que

difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene una valina en la posición 118 y un aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene, respectivamente, alanina y glicina (Fox, 2008).

- α -lactalbúmina: es la segunda proteína en concentración en el lactosuero de vaca (entre 1 y 1,5 mg/ml), y la más abundante en el lactosuero humano. La α -lactalbúmina es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica, de 123 aminoácidos, con un peso molecular de unos $14,2 \times 10^3$ Da (Mckenzie & White, 1991).
- Albúmina: La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre. En la sangre tienen como función el transporte de ácidos grasos libres de cadena larga, pero en la leche no se le atribuye ninguna en concreto. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos. En el lactosuero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,4 mg/ml.
- Lactoferrina: proteína fijadora de hierro. Tiene un punto isoelectrico próximo a 9.
- Lactoglobulinas donde destacamos la inmunoglobulina. La leche bovina madura contiene 0,6-1g de inmunoglobulinas. Las proteínas de inmunoglobulina (Ig) forman una familia diversa cuyos miembros protegen la mucosa intestinal contra microorganismos patógenos. Su papel es conferir inmunidad pasiva al recién nacido, mientras que su propio sistema de inmunidad está en desarrollo (Gapper et al., 2007; Edwards et al., 2008).

1.2.2 Caseínas

Las caseínas son las principales proteínas de la leche. Son una familia de fosfoproteínas que se encuentran en las leches de todos los mamíferos y en la leche de vaca, representan alrededor del 80% del total de proteínas, es decir, de 25 a 28 gramos por litro de leche (Horne, 2008). Se sintetizan exclusivamente en la glándula mamaria, y en la leche se encuentran en su mayor parte formando agregados multi-moleculares conocidos como “micelas”.

- *Heterogeneidad y estructura de las caseínas*

A principios del siglo XX, se dio la hipótesis de que las caseínas de la leche podían ser proteínas heterogéneas. Hoy en día se diferencian cuatro caseínas, conocidas como α_{s1} , α_{s2} , (las del subfijo indica que son “sensibles” al calcio, es decir, que pueden precipitar al asociarse con él) β y κ . Las llamadas “caseínas γ ” son simplemente fragmentos de la caseína β producidos por proteólisis por la plasmina.

La α -caseína se caracteriza por ser una proteína sensible al calcio, es decir, que puede precipitar al asociarse con él, denominada α_s mientras que la κ -caseína es insensible al calcio (Vaughn y Von Hippel, 1956). De esta manera se diferenciaron dos variantes genéticas, la α_{s1} -caseína y la α_{s2} -caseína debido a su capacidad de precipitar en asociación con el calcio. La κ -caseína representa el 12% de la caseína total, además es la responsable de la formación y estabilización de las micelas de caseína.

Todas las caseínas tienen variantes genéticas, producidas por sustitución de aminoácidos y en algunos casos por delección (Fox, 2008).

Las características de cada una de las proteínas de la caseína (Fox & McSweeney, 2013) se indican a continuación:

- α_1 , es la mayoritaria en la leche de vaca. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 ó 9 grupos fosfato. Desde el punto de vista estructural, está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos (aminoácidos 1-41, 90-113 y 132-199), y una zona muy polar (entre los aminoácidos 42 y 80), en la que se encuentran todos los grupos fosfato menos uno, lo que le da una carga neta negativa muy importante al pH de la leche (alrededor de 6,6).
- α_2 , está formada por 207 aminoácidos. Se conocen varias variantes genéticas y también varias variantes en el grado de fosforilación.
- β es la caseína más hidrofóbica, y presenta además una estructura particular, con una clara división en dos zonas. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrofóbica, mientras que los aminoácidos más hidrofílicos, y todos los grupos fosfato unidos a serinas, se concentran en el extremo N-terminal.
- κ tiene una estructura claramente distinta de la de las otras caseínas. En primer lugar, es algo más pequeña, estando formada por 169 aminoácidos. Además está muy poco fosforilada, teniendo solamente un grupo de fosfato. Esto hace que interaccione con el ión calcio mucho menos que las otras caseínas, por eso es insensible a él. Sin embargo, comparte con la caseína β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas.

Las α_1 , α_2 , β y κ - caseínas representan aproximadamente el 38, 10, 35 y 12% respectivamente de la caseína bovina. Sin embargo, la electroforesis en geles de almidón (SGE) y la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) indican una heterogeneidad mucho mayor debido a pequeñas diferencias en una o más de las caseínas, a las que se hace referencia como microheterogenia, que se debe a cinco factores:

- ◆ Variabilidad en el grado de fosforilación: todas las caseínas están fosforiladas, pero en un grado variable.
 - ◆ Polimorfismos genético.
 - ◆ Enlace disulfuro: las α_1 y β -caseínas carecen de cisteína y cistina, pero la α_2 y κ -caseínas contiene restos de cistina que se producen como enlaces disulfuro intermoleculares.
 - ◆ Variaciones en el grado de glicosilación: la κ -caseína es la única caseína glicosilada; contiene galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico.
 - ◆ Hidrólisis de las caseínas por plasmina: la leche contiene varias proteinasas indígenas, siendo la principal la plasmina, una proteinasa tipo serina. Los sustratos de caseína preferidos son β - y α_2 -caseínas. La α_1 -caseína también se hidroliza, pero la κ -caseína es muy resistente, al igual que las proteínas de suero de leche (Fox, 2008).
- *Micelas de caseína*

Las caseínas interaccionan entre sí formando una dispersión coloidal que consiste en agregados llamados micelas con un diámetro que suele variar entre 60 y 450 nm poseyendo un promedio de 130 nm y una masa que varía de 10^6 a 3×10^9 Da.

La mayoría de los modelos propuestos para la micela de caseína se clasifican en tres categorías:

- Modelo de núcleo y corteza (coat-core)

La mayoría de los modelos propuestos dentro de la categoría de núcleo y corteza se basan en estudios fisicoquímicos y consideran que la micela de caseína es una partícula esférica y liófila constituida por un centro interno e hidrofóbico de proteínas (núcleo) rodeadas por una cobertura anfifílica (corteza), cuyas proteínas son diferentes a las que constituyen el centro.

- Modelo de subunidades

Estos modelos consideran que la micela de caseína está dividida en subunidades individuales denominadas submicelas que pueden tener una composición idéntica o variable entre sí (Figura 2).

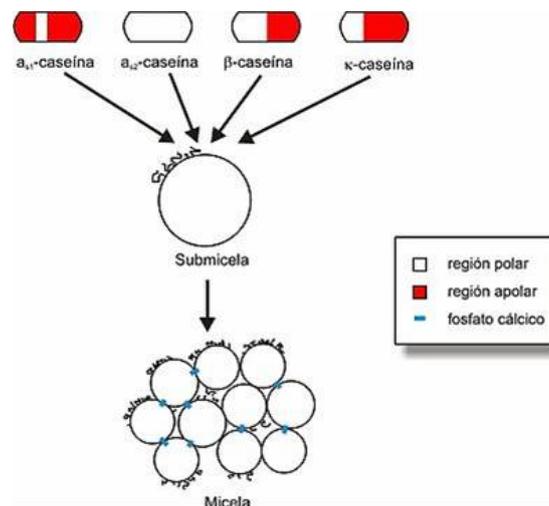


Figura 2. Modelo de micela según el modelo de submicelas (Ferrandini, Castillo, López, & Laencina, 2006).

- Modelos de estructura interna

Este modelo considera la micela de caseína como una red proteica, tridimensional, porosa y mineralizada. Estas observaciones se sustentan en las propiedades e interacciones que muestran cada uno de los distintos tipos de caseína de forma separada y que conducen a la formación de la estructura interna de la micela.

Los modelos de estructura interna no tuvieron gran aceptación a partir de los años setenta. Sin embargo, como resultado de recientes controversias generadas en relación con los modelos de subunidades, Holt (1992) y Horne (1998) han reconsiderado los modelos de estructura interna y proponen modelos originales alternativos incluidos en esta categoría.

- Modelo de Holt (1992)

Este modelo rechaza el concepto de submicela y describe la micela como un entramado flexible de caseína aproximadamente esférico y fuertemente hidratado y mineralizado.

- Modelo de doble unión de Horne (1998)

El modelo de doble unión propuesto por Horne podría considerarse como una extensión del modelo de estructura interna de Holt. El modelo de doble unión, a diferencia del de Holt, sugiere que las interacciones proteína-proteína son

esenciales y considera que la naturaleza anfílica de las caseínas es la responsable de la polimerización y estructuración micelar. El fosfato de calcio coloidal (CCP) se puede extraer fácilmente de las micelas de caseína mediante acidificación de la leche a temperaturas por debajo de 20°C sin que se ocasione alteración aparente de la estructura micelar. Además, la adición de urea induce la disociación de la micela de caseína sin que se produzca la disolución del CCP (Ferrandini et al., 2006).

La materia seca de las micelas es el 94% de proteína y 6% de especies de bajo peso molecular que consiste principalmente en fosfato de calcio con algo de magnesio y citrato y trazas de otras especies, denominadas colectivamente fosfato cálcico coloidal (CCP). Se considera que hay 1014-1016 micelas/ml de leche.

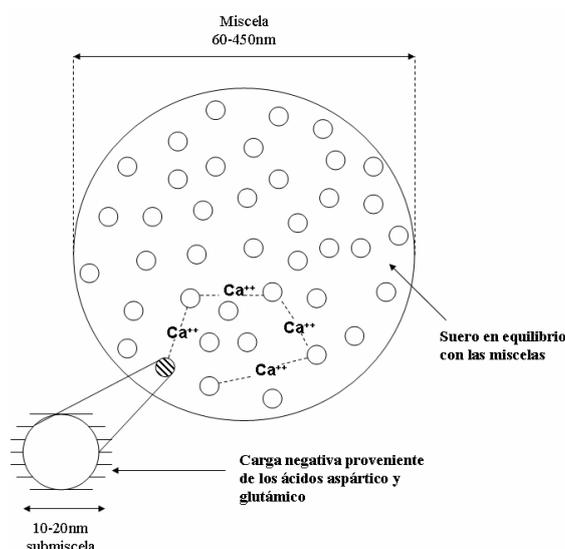


Figura 3. Micela de caseína según el modelo de Horne (1998).

Las submicelas se constituyen a partir de la interacción constante entre las caseínas α , β y κ . Hay que resaltar la función estabilizadora de la caseína κ contra la precipitación de calcio de otras fracciones proteínicas (Fox, 2008).

Debido a su alto contenido en grupos fosfato, que se producen en las caseínas α_{S1} , α_{S2} y β tienen una fuerte tendencia a unirse a iones metálicos, que en el caso de la leche son principalmente el calcio (Ca^{2+}). Sin embargo, la κ -caseína, que contiene solo un grupo orgánico de fosfato, se une débilmente y es soluble en todas las concentraciones de calcio que se encuentran en los productos lácteos. Se sugiere que el fosfato de calcio se une a los grupos NH_2 -de la lisina; el calcio interactúa con el grupo carboxilo ionizado (COO^-) según lo ilustrado en la Figura 4.

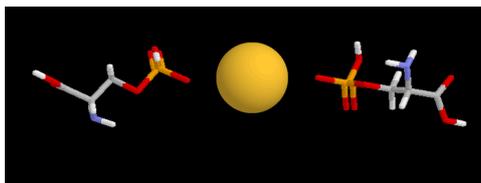


Figura 4. Puente de calcio entre dos fosfoferrinas (Calvo, s. f.).

Las micelas son portadores también de magnesio y zinc, y por lo tanto son muy importantes desde el punto de vista nutricional (Fox & McSweeney, 2013).

- *Estabilidad de las micelas de caseína*

Las micelas son estables a:

- Altas temperaturas, coagulando sólo a 140°C durante 15-20 minutos al pH normal de la leche. Dicha coagulación no se debe a la desnaturalización de la proteína, sino a los principales cambios que se producen en el sistema de la leche como resultado del alto tratamiento térmico.
- Compactación: el sedimento recuperado por ultracentrifugación se puede volver a dispersar fácilmente y las propiedades de la dispersión son esencialmente similares a las de las micelas de origen.
- Homogeneización a presión normal o alta.
- Altas concentraciones de Ca^{+2} , hasta por lo menos 200mM, a temperaturas de hasta 50°C (Yada, 2004).

Sin embargo, varios procesos pueden desestabilizar, dispersar o afectar las propiedades de las micelas de caseína y, por lo tanto, de la leche. A continuación se citan los efectos con mayor impacto en las caseínas:

- Acidificación: la reducción del pH de la leche tiene varias implicaciones significativas para las propiedades fisicoquímicas de las micelas de caseína y, por lo tanto, las propiedades de la leche. Los cambios en las micelas de la caseína con la reducción del pH están mediados en parte por los cambios en el contenido de fosfato de calcio coloidal (CCP) de las micelas. El CCP puede disolverse y eliminarse de las micelas mediante acidificación en frío (4°C) a pH 4,6, seguido de diálisis frente a un gran exceso de leche a granel. Es una técnica conveniente y ampliamente utilizada para variar el contenido de CCP de la leche (Huppertz et al., 2018).
- Hidrólisis de k-caseína por enzimas proteolíticas: algunas proteinasas, especialmente quimosina, catalizan una hidrólisis muy específica de k-caseína. Como resultado, la caseína se coagula en presencia de Ca^{+2} u otros iones divalente (Yada, 2004).
- Las caseínas se precipitan con etanol al 40% a pH 6,7 y a concentraciones más bajas si el pH se reduce.
- Las micelas también se disocian con urea (5 M) o elevando el pH por valores superiores a 9 (Fox & McSweeney, 2013).

En la Tabla 2 se indica un resumen de las principales diferencias de las proteínas de la leche.

Tabla 2. Comparación de las propiedades claves de las caseínas y las proteínas del suero lácteo (Fox, 2008).

Características	Caseínas	Proteínas del suero lácteo
Solubilidad a pH 4,6	Insolubles	Solubles
Coagulabilidad después de proteólisis limitada	Coagulables	No coagulables
Estabilidad al calor	Muy estables (hasta 140°C)	Desnaturalización a 90°C
Azufre	Bajo contenido (0,8%)	Alto contenido (1,7%)
Sitio de biosíntesis	Glándulas mamarias	Glándulas mamarias y sangre
Estado físico en la leche	Grandes agregados (micelas)	Monómeros (pequeñas estructuras cuaternarias)

1.2.3 Obtención de caseína y proteínas del suero de la leche

Los métodos de obtención de caseínas y de proteínas séricas están basadas en sus características y en los factores que influyen en su desestabilización citados en el punto anterior. Los métodos más ampliamente utilizados son los siguientes (Fox, 2003):

- ◆ Precipitación isoelectrica a pH 4,6 a 20°C: las caseínas son insolubles a este pH y las proteínas del suero lácteo son solubles, por lo que se produce una separación. El precipitado se recupera por filtración o centrifugación a baja velocidad.
- ◆ Métodos de eliminación de sales: la caseína puede precipitarse mediante varias sales. Generalmente por sulfato de amonio a 260 g/l o cloruro de sodio saturado. Las inmunoglobulinas precipitan con las caseínas.
- ◆ Filtración en gel: es posible separar las caseínas por cromatografía de permeación.
- ◆ Precipitación por etanol: las caseínas precipitan de la leche con 40% de etanol.
- ◆ Coagulación de cuajo: las micelas se desestabilizan por proteólisis.
- ◆ Caseinatos: la caseína isoelectrica y algunas de las otras formas de caseína preparadas como se describió anteriormente, son insolubles en agua pero pueden convertirse en caseinatos solubles en agua por dispersión en agua ajustando el pH a 6,7 generalmente con hidróxido de sodio para producir caseinato de sodio (Fox & McSweeney, 2013).
- ◆ Ultracentrifugación: en la leche, la caseína existe en forma de grandes micelas que pueden sedimentarse por centrifugación a 1000000 X g por hora; mientras que las proteínas del suero no son sedimentables. Desde los años 90, la industria de las proteínas séricas se ha desarrollado gracias a la utilización de tecnologías de separación tales como la ultrafiltración (UF), diafiltración (DF) y la microfiltración (MF) a partir de leche desnatada (Novak et al., 1992; Zydney 1998; Maubois 2002).

1.3 CONCENTRADOS PROTÉICOS

La Federación Internacional de Productos Lácteos autoriza la utilización los concentrados de proteína láctea (CPL) y los aislados de proteínas de leche (MPI), además del aislado de proteínas séricas (WPI). Los CPL son obtenidos a partir de leche desnatada pasteurizada y generalmente ultrafiltrada que permite eliminar la lactosa y los minerales solubles, seguido de una atomización (Novak, 1996). Estos productos pueden contener entre 42 y 85% de proteína. En el caso de 85%, se utiliza una técnica complementaria de diafiltración (Getler et al., 1997; Singh, 2007) y a partir de 90% de proteína se considera MPI.

Los CPL se utilizan como ingredientes en muchas aplicaciones: nutrición infantil y geriátrica, suplementos de dieta y de nutrición deportiva, incluida en la fabricación de queso y yogur (Agarwal, Beausire, Patel, & Patel, 2015). Actualmente, los CPL se usan en la elaboración de productos que incluyen los quesos procesados, el queso crema, el helado, el yogurt y otros lácteos fermentados, y sustitutos bebibles de alimentos. El tipo de CPL que se utiliza depende del uso y de la fórmula en cuestión. Generalmente, los CPL con bajo nivel de proteína se usan como ingredientes para quesos, mientras que los CPL con niveles de proteína más altos se usan en bebidas. Se utilizan en productos que tienen como ingrediente leche deshidratada sin grasa o leche en polvo descremada pero que necesitan niveles más altos de proteína, en los que tradicionalmente se usa caseína (Hernández-Rojas, 2014).

El principal problema de CPL y MCI es la insolubilidad que ocurre principalmente en los productos altamente concentrados (Shuck et al., 1999) y que aumenta con el tiempo y la temperatura de almacenamiento (Anema et al., 2006; Havea, 2006; Gazi & Huppertz, 2015). Esta insolubilidad viene principalmente de la caseína micelar, mientras las proteínas séricas y otros constituyentes no pierden su solubilidad (Anema et al., 2006; Gazi & Huppertz, 2015). En los últimos años el uso de aditivos como el citrato ha sido utilizado para mejorar la solubilidad después de la atomización (Lu et al., 2015). La utilización de estos productos en la fabricación de queso supone menos problemas ya que la reconstitución a 50°C de los concentrados es mejor (Havea, 2006).

1.4 ATOMIZACIÓN Y LIOFILIZACIÓN

La deshidratación de alimentos sigue siendo una de las operaciones unitarias más relevantes y desafiantes en el procesamiento de alimentos (Vega-Mercado et al., 2001).

La leche en polvo tiene un contenido en agua que oscila entre 2,5% y 5%, lo que limita el crecimiento bacteriano y reduce el coste de su transporte y almacenamiento. Además, en los últimos 25 años, la industria láctea ha desarrollado nuevos procesos tecnológicos para extraer y purificar proteínas. La mayoría de las proteínas, utilizadas como ingredientes nutricionales o funcionales, se comercializan en forma deshidratada (Schuck, 2008).

➤ **Atomización.**

El proceso de secado por atomización se considera un método convencional para convertir líquidos en polvo pero a un nivel aceptable de degradación y oxidación de compuestos volátiles (Keshani et al., 2015). En este secado, la leche pasteurizada y ultrafiltrada, se transforma en una pulverización de pequeñas gotas exponiéndolas a un flujo de aire caliente. El área de superficie de las gotas provoca que la evaporación del agua tenga lugar muy rápidamente, convirtiendo las gotas en partículas de polvo seco (Schuck, 2008).

El secado por pulverización es utilizado en muchas aplicaciones industriales de los sectores cerámico, químico, alimentario, farmacéutico (Mondragón et al., 2013).

En la Figura 5, se indica el proceso de secado por atomización. Inicialmente la gota experimenta un aumento de calor sensible hasta la temperatura húmeda correspondiente a la temperatura del aire de secado (tramo 0-1). En ese instante se inicia el primer periodo de secado o periodo de velocidad de secado constante (tramo 1-2). En esta etapa, el líquido se desplaza desde el interior de la gota lo suficientemente rápido como para mantener la superficie saturada de humedad. Como consecuencia, la evaporación de líquido se produce en la superficie. Durante este periodo, la velocidad de secado permanece constante y su valor es el máximo alcanzado en todo el proceso. Si las condiciones ambientales de secado no varían, la temperatura de la gota permanece igual a la temperatura húmeda del aire en todo el intervalo de tiempo.

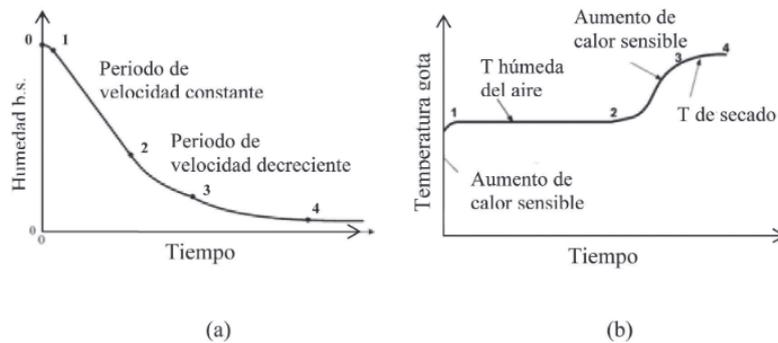


Figura 5. (a) Variación de la humedad con el tiempo. (b) Evolución de la temperatura de la gota durante el secado (Mondragón et al., 2013).

En un determinado momento, se alcanza la humedad crítica (Figura 5a, punto 3) en la que la migración de líquido ya no es capaz de mantener la superficie saturada. La concentración de líquido en la superficie de la gota se reduce a un valor mínimo y se inicia el segundo periodo de secado o periodo de velocidad de secado decreciente (tramo 3-5). En él, las partículas primarias forman una costra de aglomerados sumergida en el líquido. En el secado posterior, la costra aflora a la superficie de la gota y se transforma en una costra seca, determinando el diámetro final del gránulo que deja de contraer.

La gota está formada por dos zonas: la costra sólida de estructura porosa, y el núcleo húmedo formado por líquido y sólido. La costra formada genera una resistencia adicional a la evaporación del líquido. A medida que transcurre el proceso y el espesor de la costra aumenta, disminuye la velocidad de secado (Mondragón et al., 2013).

Básicamente, un sistema de secado por atomización consta de cinco componentes básicos (Schuck, 2008):

1. Cámara de secado, donde se mezcla el aire caliente y el alimento finamente disperso. Puede ser horizontal aunque en la industria láctea el diseño es generalmente vertical con una base cónica o plana.
2. Dispensador de aire con un sistema de suministro de aire caliente. El aire se puede calentar de dos maneras, o bien de manera directa a través de un gas o bien de manera indirecta por medio de vapor, gas, petróleo o electricidad. La cámara de flujo de aire puede estar en modo corriente paralela, o contracorriente o mixta. Aquí tienen un papel importante dos de los cuatro parámetros a tener en cuenta en la atomización, que son la temperatura del aire de entrada y el flujo de aire.
3. Sistema de pulverización o atomizador (discos centrífugos, boquillas de presión o boquillas de dos fluidos), que genera pequeñas gotas con una gran superficie para la evaporación del agua, y que sirve además para controlar la velocidad de flujo de entrada del producto en el secador. En este apartado el parámetro a tener en cuenta es el caudal de materia prima.
4. Sistemas para separar las partículas secas del aire (generalmente ciclones y filtros) donde tendremos en cuenta la temperatura de salida del producto, y
5. Uno ó varios aparatos impulsores de aire para hacerlo circular a través del sistema.

La atomización ha sido utilizada habitualmente para obtener concentrados proteicos de leche. El valor recomendado de humedad relativa para procesar leche entera en polvo es de aproximadamente 1,4 (Hahne y Passos, 2002). Para alcanzar esta condición, es necesario operar a una velocidad de pulverización con una temperatura de entrada entre 160 °C y 175 °C, con un máximo de 180 °C ya que a esta temperatura los daños térmicos en la leche son más importantes (Birchal et al., 2005).

Las temperaturas de entrada de producto utilizadas en el caso de caseínas micelares nativas obtenidas por microfiltración de membrana varían de 150-200°C (Schuck, 2008). Las caseínas micelares atomizadas con una temperatura de entrada entre 150 y 170°C presentan un índice de solubilidad (método normalizado de la Federación Internacional de la Leche) entre el 72 y el 92% con un índice de dispersión del producto variable entre 7 y 38%.

El almacenamiento entre 20 y 30 °C del concentrado de leche después de atomización parece ser estable durante 200 días sin producirse degradación del producto (Aalaei et al., 2016).

➤ **Liofilización.**

La liofilización es el secado por sublimación con una fase previa de congelación a baja temperatura. El producto obtenido por liofilización es un polvo o una sustancia dura y porosa, muy higroscópica, que necesita ser conservada en envases herméticamente sellados. Cuando se le restituye la cantidad de agua evaporada, el producto reproduce muy cercanamente su aspecto y sus propiedades originales (Orrego Alzate, 2008).

En el proceso de liofilización podemos encontrar dos etapas:

1. Congelación del producto: esta fase es importante ya que la congelación debe garantizar que sufrirá pocas alteraciones en el proceso de sublimación (Orrego Alzate, 2008).
2. Secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (a vacío). El proceso de sublimación es mucho más eficiente a presiones mínimas debido a que el agua se extrae por un impulso originado por el gradiente de presión total (Alvarado, 2014).

Durante la sublimación podemos distinguir tres fases que se muestra en la Figura 6:

- Fase 1: Llamada etapa conductiva. Inicialmente, por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto, entre un 10 y 15% del tiempo total del proceso.
- Fase 2: primera etapa difusiva. Muestra un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado.

Estas dos primeras fases se denominan secado primario, en ellas se elimina la mayor parte del agua del producto, entre un 75-90%.

- Fase 3: Segunda etapa difusiva, llamada también secado secundario. La velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. Esto es debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación. Puesto que la difusividad de los aromas disminuye sensiblemente cuando la humedad es pequeña, es posible en esta etapa incrementar la temperatura de la calefacción y del producto hasta valores del orden de 50°C, dependiendo del material que se trate.



Figura 6. Etapas del proceso de liofilización (Orrego Alzate, 2008).

Como en todo proceso de secado, coexisten los fenómenos transferencia de masa y calor, la curva de transferencia de calor en función del tiempo se obtiene multiplicando la cantidad de agua sublimada por su correspondiente calor de sublimación (Orrego Alzate, 2008).

En cuanto al almacenamiento, los productos liofilizados y adecuadamente empacados, pueden ser guardados por largos periodos de tiempo ya que en buena medida retienen las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas de sus estados frescos. La liofilización, reduce las pérdidas de calidad debidas a deterioro por reacciones químicas, causado por degradación enzimática y no enzimática (Orrego Alzate, 2003).

La principal ventaja de esta técnica es la calidad superior del producto final. Sin embargo, visto el costo del proceso, la liofilización queda generalmente reservada para productos con un alto valor añadido, semejantes a los productos farmacéuticos o alimentos para bebés y ciertas especies. Una de las causas de este elevado costo es la larga duración del proceso. En efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados, debido a la textura porosa, afectan de manera significativa y negativa a la transferencia de calor y de masa y por consecuencia a la duración de la operación de deshidratación (Ramírez-Navas, 2007).

La liofilización de concentrados proteicos lácteos es un estudio poco habitual debido al elevado coste que este proceso supone, pero es importante recordar que el método de secado por liofilización permite dar mayor estabilidad a los principios activos y conseguir una rehidratación más rápida (Schuck et al., 1994). Las caseínas han sido utilizadas en variadas aplicaciones en sistemas alimentarios y farmacéuticos en forma de films, hidrogeles, emulsiones y micro y nano-partículas (Ranadheera et al., 2016) debido a su elevada actividad superficial (Mitchell et al., 1970) y debido a su carácter anfifílico, por lo tanto presenta buenas propiedades emulsionantes y estabilizadora de espumas (Dickinson & Parkinson, 2004).

En la industria farmacéutica se puede emplear esta tecnología para diferentes propósitos como controlar la liberación de una dosis adecuada del principio activo, enmascarar el sabor de medicamentos masticables, reducir la irritabilidad gástrica del medicamento (Reyna et al., 2015). Es por esto por lo que se podría considerar la técnica de liofilización como un método de obtención del concentrado proteico lácteo en polvo como principio activo para fines de microencapsulación, entre otros. También se ha observado que los concentrados proteicos liofilizados presentan el menor impacto en la estructura de las proteínas (Aalaei et al., 2016).

1.5 REHIDRATACIÓN DE LOS POLVOS LÁCTEOS

Las propiedades de un producto en polvo van afectar al grado de instantaneidad, es decir, a su capacidad de reconstituirse casi de inmediato en un medio líquido. Para que un polvo exhiba buenas características de reconstitución, es necesario un equilibrio apropiado entre las mismas (Sapper et al., 2015).

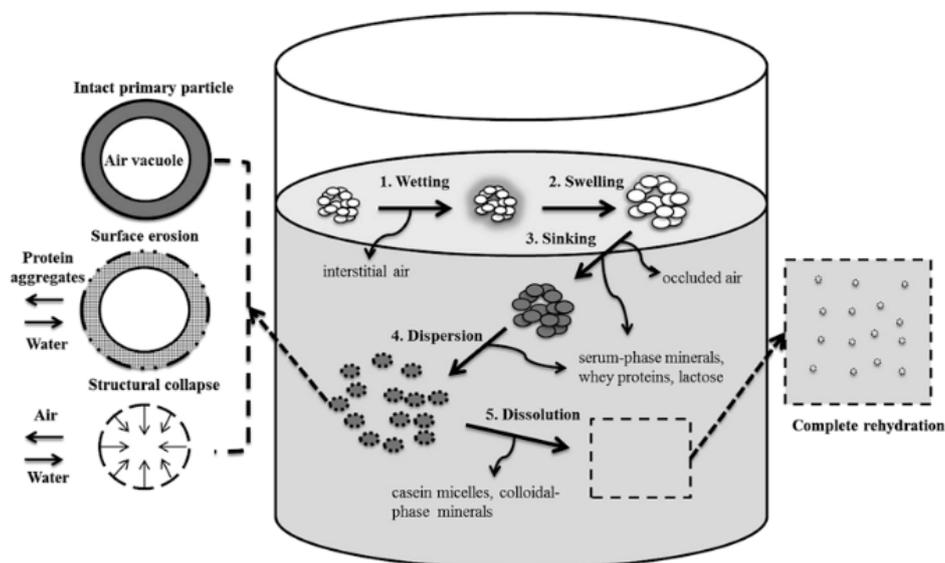


Figura 7. Representación esquemática del perfil de rehidratación para un polvo lácteo aglomerado con alto contenido proteínico, que muestra 1 humectación (wetting), 2 hinchazón (swelling), 3 hundimiento (sinking), 4 dispersión (dispersion) y 5 disolución (dissolution) (Crowley et al., 2016).

Podemos distinguir 5 etapas en el proceso de rehidratación de un polvo lácteo (Figura 7):

1. La etapa de **humectación** de la rehidratación del polvo se refiere a la absorción inicial de agua por las partículas de polvo introducidas, la posterior inmersión de las partículas de polvo mojado y su desaparición definitiva de la superficie libre del líquido.
2. El paso siguiente se conoce como **hundimiento**. Después de que un polvo se ha humedecido suficientemente, parte del aire ocluido se libera de las partículas primarias y se reemplaza por solvente líquido, creando partículas más densas que descienden a través de la solución. Para que ocurra hundimiento, la partícula mojada debe ser más densa que el líquido en el que está suspendido.
3. El **hinchamiento** se observa como un pico de viscosidad después de la humectación inicial de las partículas.
4. La **dispersión** implica la fragmentación de partículas de polvo humedecidas y está estrechamente asociada con las propiedades instantáneas de un polvo. La dispersión del polvo en aglomerados, la fragmentación de los aglomerados en partículas primarias y la erosión de las partículas primarias pueden ocurrir durante esta etapa.
5. La **solubilidad ó disolución** es la etapa final de la rehidratación de polvos lácteos y coincide con la desaparición de completa de las estructuras granulares y la liberación de moléculas constituyentes, es decir, proteínas, hidratos de carbono, minerales... (Crowley et al., 2016)

Las propiedades físicas del producto asociadas a estas fases, conforman el concepto de propiedades instantáneas. Así, la solubilidad es la velocidad y grado en que los componentes de las partículas de polvo se disuelven en el agua, en tanto que la dispersabilidad es la facilidad con la que los polvos se distribuyen como partículas individuales en la fase líquida (Shittu & Lawal, 2007).

Las propiedades de los polvos de rehidratación pueden verse afectadas por la selección de materias primas, pre-tratamientos, métodos de procesado y condiciones de almacenamiento. Además de otras propiedades intrínsecas como superficie, composición, estructura y tamaño de partícula y las condiciones de rehidratación.

2. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo es ver el efecto de la atomización y la liofilización sobre un concentrado proteico de caseína micelar.

Para ello se han realizado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la atomización y de la liofilización sobre las características físico-químicas del producto, principalmente color y actividad de agua.
- Determinar el efecto de la atomización y de la liofilización sobre la dispersabilidad y la solubilidad del producto.
- Determinar la estabilidad física del producto reconstituido tras la atomización y la liofilización.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECONSTITUCIÓN DE LA CASEÍNA MICELAR

En este trabajo se ha utilizado un concentrado proteico lácteo (Milk Protein Isolate) con un porcentaje en proteína superior al 87%, llamado Prodiet 87B (Ingredia, Francia) cuya ficha está adjunta en el *Anexo I*. Este producto es rico en caseína micelar ya que más del 90% del contenido pertenece a esta fracción proteica. Este producto en polvo, será la muestra control.

Tabla 3. Principales características de Prodiet 87B.

Características físicas	
Forma	Polvo libre
Color	Cremado-blanco
Sabor y olor	Lechoso
Características químicas	
Proteínas	83,0%
Cenizas	8,5%
Humedad	5,0%
Carbohidratos (Lactosa)	2,0%
Grasas	1,5%
Características microbiológicas	5000 UFC/g

Para la realización de la atomización y la liofilización se necesita materia prima en estado líquido, por lo que el concentrado fue reconstituido al 8% (p/p) en agua desionizada. Para ello, el producto se agitó sobre una placa MultiStirrer 15 (VELP® Scientifica, Italia) a temperatura ambiente, en posición 4 (553,3 vueltas/min), durante una hora. Tras ese tiempo, se ultrasonizó con el sonotrodo Tip H7 (diámetro 7 mm) acoplado al aparato Hielscher UP400S (Hielscher – Ultrasound Technology, Alemania) con una potencia de 400W, un ciclo completo y una amplitud 20% durante 30 minutos. La estabilidad física del producto fue evaluado con el análisis de transmitancia/absorbancia con el aparato Turbiscan LAB™. El producto era estable durante las 24 horas posteriores a su preparación.



Figura 8. Muestra en el ultrasonidos.

3.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

3.2.1 pH

El pH se midió con el pH-metro Basic 20 (Crison, España) y con el electrodo 52-01 (Crison, España) previamente calibrado con las soluciones tampón pH 7,00 y pH 4,01. Las medidas fueron realizadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y por triplicado.

3.2.2 Color

El color se realizó con el espectrofotómetro de mano CM-2600d/2500d (Konica Minolta, Japón) con iluminante D65, ángulo de observación 10° y en el modo SCI (componente especular incluido), basado en el sistema CIELAB.

Las características cromáticas vienen definidas por las coordenadas colorimétricas o de cromaticidad que son la luminosidad (L^*), componente de color rojo/verde (a^*), componente de color amarillo/azul (b^*).

El método CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) localiza los colores en el espacio por tres coordenadas de color: L^* (luminosidad, eje y: claridad del color, representa la diferencia entre la luz ($L^*=100$) y la oscuridad ($L^*=0$)), a^* (eje z: diferencia entre el verde ($-a^*$) y el rojo ($+a^*$) ($a^*>0$ rojo, $a^*<0$ verde)), b^* (eje x: representa la diferencia entre el azul ($-b^*$) y el amarillo ($+b^*$) ($b^*>0$ amarillo $b^*<0$ azul)), como se observa en la Figura 9 (Pascualetti et al., s. f.).

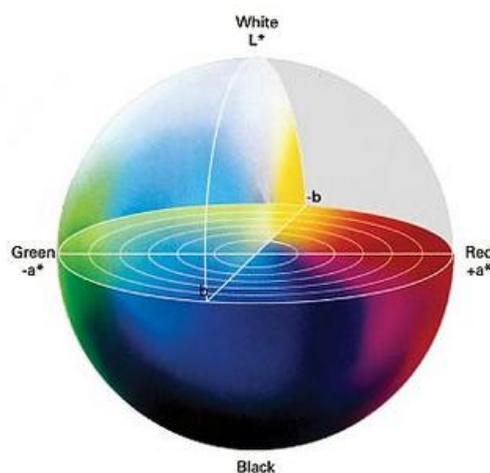


Figura 9. Sistema CIELAB.

La medida se realiza con un vaso de cuarzo que viene con el equipo tapado con una superficie blanca, en este caso un vaso de plástico blanco. El aparato es previamente calibrado según lo indica el fabricante con el cero (en condiciones de oscuridad o ausencia de fuentes de luz a un metro de distancia) y con el blanco (CM-A145.). Las medidas se realizan por triplicado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.3 Estabilidad física

La estabilidad física se determinó con Turbiscan LABTM FORMULATION SMART (Formulation, Francia), equipo empleado para el análisis de caracterización de dispersiones concentradas. El equipo emite una fuente luminosa gracias a un diodo electroluminiscente en el infrarrojo cercano (λ aire=880 nm), dos captadores ópticos sincronizados reciben la luz que atraviesa la muestra (180° a partir del rayo incidente, detector de transmisión) y la luz retrodifusa por la muestra (45° a partir del rayo incidente, detector de retrodifusión).

El aparato realiza medidas en toda la largura del recipiente cada cierto tiempo. Con este tipo de análisis, se puede observar fenómenos de sedimentación, cremado, floculación, agregación y/o coalescencia.



Figura 10. Turbiscan Lab Formulation Smart Scientific.

La cantidad de muestra analizada fue de 20 ml y se realizaron escaneos cada 5 min con una duración de 2 horas 25 segundos. Los resultados de retrodifusión fueron analizados con el programa Turbisoft 2.0. Este programa permite calcular el Índice de Estabilidad Turbiscan (TSI) según la ecuación siguiente:

$$\text{tsi} = \frac{\sum_h |\text{scan}_i(h) - \text{scan}_{i-1}(h)|}{H}$$

Donde:

- H: altura total de la muestra.
- h: posición de la medida.

El TSI fue calculado en la parte alta (de 0 a 13 mm), media (de 13 a 26 mm) y baja (de 26 a 40 mm) de la muestra. Este parámetro sirve para comparar y caracterizar de forma rápida la estabilidad física de varias formulaciones, conforme mayor es el valor de TSI menos estable es la muestra.

3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico se realizó sobre 3 tipos de bacterias: aerobios mesófilos, psicrótrofos y bacterias ácido-lácticas.

Los medios empleados para la siembra fueron:

- *Plate Count Agar* (PCA, VWR Chemicals PROLABO®) en el caso de mesófilos y psicrótrofos y se trata de un medio genérico.
- (MRS) Medio específico para el aislamiento y enumeración de lactobacilos según Man, Rogosa y Sharpe (ISO 9232:1999, ISO 15214:1998).

Los medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones del fabricante y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos en el autoclave Presoclave II (J.P Selecta, España). Cuando los medios alcanzaron los 45-50°C, fueron dispensados en placas Petri de diámetro de 100 mm (VWR International Eurolab, España) dentro de una cabina de flujo laminar INDELAB (LABOLAN, España). Las placas se prepararon al menos 24 horas antes de la siembra.

La siembra se realizó con cuatro diluciones de muestra en agua de peptona (Buffered peptone water, VWR Chemicals) y por triplicado en una cabina de flujo laminar utilizando un mechero de etanol para asegurar que las condiciones fueran asépticas.

Se emplearon dos técnicas diferentes de siembra, el método de siembra automática en espiral y el método de siembra en superficie. Para la siembra automática en espiral se empleó el sembrador automático Eddy Jet 2 (IUL, España) empleando un volumen de inóculo de 100 µl por placa (Figura 11).



Figura 11. Sembrador automático Eddy Jet 2 (IUL, España).

En el método de siembra en superficie se utilizó un volumen de inóculo de 100 µl, el método consiste en extender el volumen inoculado mediante unas perlitas de vidrio estériles según la norma UNE-EN-ISO- 7218:2008/A1.

Tras la siembra, las condiciones de incubación fueron las siguientes:

Tabla 4. Temperatura, tiempo y ubicación de la incubación de cada microorganismo.

Microorganismo	Temperatura (°C)	Tiempo (horas o días)
Mesófilos	30	48/72h
Psicrótrofos	5	7 días
Lácticas	30	5 días

El recuento microbiológico en unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se realizó de manera diferente según el método utilizado. En el caso de la siembra automática en espiral, la placa se divide en 8 sectores (Figura 12) y se realiza el recuento en un sector (verde) y en el opuesto (rojo). Las UFC/mL se calculan con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N' + N''}{V(\text{sector})/4} = \text{UFC/mL}$$

Siendo:

C= UFC/mL

N'= UFC contadas en el primer octavo*

N''= UFC contadas en el octavo opuesto.

V (sector)= Volumen en función del tamaño de placa.

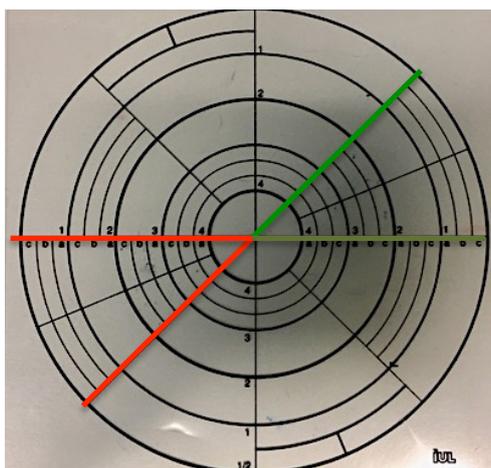


Figura 12. Sectores para el recuento microbiológico con sembradora automática.

En cuanto al recuento microbiológico tras la siembra en superficie o perlitas se hace recuento de toda la placa. Se diferencia 4 situaciones según la norma UNE-EN-ISO- 7218:2008/A1:

- En el caso que el recuento sea entre 10 y 300 colonias, les UFC se calcula como la media ponderada de dos diluciones consecutivas usando la siguiente fórmula.

$$N = \frac{\Sigma C}{V * 1,1 * d}$$

Siendo el numerador la suma de las colonias contadas en las dos placas escogidas de las dos diluciones consecutivas; V es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros; y d es la dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

- Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo cuatro, el resultado se calcula siguiendo la siguiente fórmula:

$$NE = \frac{C}{V * d}$$

Y se expresa como número estimado NE de microorganismos por mililitro Siendo c el número de colonias contadas en la placa escogida, V es el volumen de inóculo utilizado en la placa, en mililitros; y d es la dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

- Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: “Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 4/Vd por ml”
- Si la placa que contiene la muestra para análisis o la primera dilución inoculada no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera: “menos de 1/Vd microorganismos por mililitro”.

3.4 ATOMIZACIÓN

El equipo utilizado fue el atomizador Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Flawil, Suiza) como muestra la Figura 13. Este aparato consta de una tobera de pulverización, de una torre de secado y un sistema de separación de producto. Además, permite aplicar una temperatura de entrada de 150 a 220°C, un caudal de producto del 10 al 100% y un caudal de aire de 80 a 800 l/h.



Figura 13. Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Flawil, Suiza).

3.5 LIOFILIZACIÓN

En el caso de la liofilización fue el Lyobeta 25 (Telstar, España) como muestra la Figura 14. Las muestras son colocadas en placas Petri de tamaño 15cm de diámetro x 2cm de alto y sobre placas de acero inoxidable.



Figura 14. Liofilizador Lyobeta 25 (Telstar, España)

3.6 MÉTODOS DE RECONSTITUCIÓN

Para determinar el efecto de la atomización y de la liofilización sobre el producto, se mide el color, la actividad de agua, el índice de dispersión, el índice de solubilidad, el tamaño de partícula y la estabilidad física.

3.6.1 Color

El color se realiza con el producto seco con la misma metodología que en el producto reconstituido (punto 3.2.2).

3.6.2 Actividad de agua

La actividad de agua (A_w), que se refiere a la cantidad de agua libre que está presente para reacciones que se llevan a cabo en un alimento. El equipo utilizado fue LabMASTER-aw (Novasina, Liechtenstein).



Figura 15. Medidor de actividad de agua (A_w).

3.6.3 Índice de dispersión

El índice de dispersión utilizado está basado en el de (Schuck et al., 2013). El producto atomizado o liofilizado fue reconstituido en agua destilada al 5% (p/p) a temperatura ambiente utilizando una cuchara de uso doméstico para su agitación durante 15s en un sentido y otros 15s en el sentido opuesto. La muestra se filtró a través un tamiz (Retsch GmbH®, Alemania) de 200 micras.



Figura 16. Tamiz de 200 micras (Restch GmbH®, Alemania).

El volumen filtrado junto con la muestra inicial fue secado en estufa a 105°C durante 16 horas en placas de aluminio de 140 mL. Tras el transcurso de este tiempo, el extracto seco fue determinado utilizando una balanza de precisión (PAS214C, Fisher Scientific SAS, Boulevard Sébastien Brant, 67400 Illkirch- Graffenstaden, France). La determinación del extracto seco del volumen filtrado fue realizado por triplicado y fue comparado con el extracto seco de la muestra inicial. Este índice fue realizado por triplicado en cada muestra.

El índice de dispersión (DI) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de dispersión (\%)} = \frac{\text{Sólidos totales del volumen filtrado}}{\text{sólidos totales de la solución}} \times 100$$

3.6.4 Índice de solubilidad

El índice de solubilidad (Eshpari et al., 2014) consiste en solubilizar el producto en agua al 5% (p/p) a temperatura ambiente durante 3 horas usando un agitador MultiStirrer 15 (VELP® Scientifica, Italia) a 868,89 vueltas/min. Una vez solubilizada, la muestra es centrifugada a 460 g durante 10 minutos en una centrifuga (Hermle Z 320, Alemania) a temperatura ambiente. A continuación, se realiza el extracto seco del sobrenadante y de la muestra inicial a 105°C durante 16 horas en una estufa. Este índice fue realizado por triplicado en cada muestra.

El índice de solubilidad es calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de solubilidad (\%)} = \frac{\text{Sólidos totales del sobrenadante}}{\text{sólidos totales de la solución}} \times 100$$

3.6.5 Tamaño de partícula

La medida del tamaño de partícula (nm) fue realizada para los ensayos llevados a cabo con la reconstitución de caseína micelar al 5% durante 3 horas por el laboratorio de Área de Materiales del Centro Multidisciplinar de Tecnologías para la Industria (CEMITEC, Noáin, Navarra).

Este parámetro físico es medido gracias al Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments GmbH, UK) basándose en la técnica DLS (Dynamic Light Scattering). Las diluciones empleadas para la preparación de muestra fueron de 0,2 mL muestra en 20 mL agua desionizada. Cada muestra fue analizada por triplicado. Es importante destacar que el tamaño de partícula se hace sobre la parte mas soluble, es decir, es una medida realizada cuando todo es soluble y no hay partículas en suspensión. Los datos incluidos son la media del tamaño de partícula y la polidispersión de las partículas (variabilidad entre partículas).

3.6.6 Estabilidad física

La estabilidad física del producto se realiza utilizando el Turbiscan LAB™ y con el protocolo citado en el punto 3.2.3. En este caso el producto está reconstituido al 5% (p/p) en agua desionizada durante 3 horas.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el software de Statgraphic Centurion X64. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). En el caso de observar diferencias, se clasificaron grupos con las pruebas de comparación post hoc (prueba de rango múltiple de Scheffe) con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

3.8 PLAN EXPERIMENTAL

Las condiciones de atomización y liofilización se indican en la Tabla 5 y 6, respectivamente. Los parámetros fueron elegidos en función de la revisión bibliográfica (apartado 1.4 Atomización y liofilización).

Tabla 5. Condiciones atomización.

ATOMIZACIÓN	
Temperatura del aire de entrada (°C)	160°C
Flujo del aire (L/h)	600 L/h (parámetro fijo)
Temperatura de salida del producto	Variable en función de la temperatura de entrada
Caudal de materia prima	20%

En cuanto a las condiciones de liofilización, como se menciona en la introducción el apartado 1.4 Atomización y liofilización, existen dos secados en esta última técnica, secado primario, en el que se elimina la mayor parte del agua del producto, entre un 75-90% y secado secundario donde la velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. En este proyecto se ha querido ver el efecto del secado primario por lo que se hicieron dos liofilizaciones.

Tabla 6. Condiciones liofilización.

	LIOFILIZACIÓN 1	LIOFILIZACIÓN 2
Temperatura (°C)	25	25
Presión (mBar)	0,017	0,017
Tiempo (horas)	23	8

Tras los tratamientos, las muestras se almacenaron en bolsas de plástico transparentes (4 cm de ancho x 6 cm de largo) con cierre zip. Estas bolsas se termosellaron con la termoselladora (Sammic, España) y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta el día de la realización de los métodos de reconstitución (color, a_w , índice de dispersión, índice de solubilidad, tamaño de partícula y estabilidad física).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una primera parte del Trabajo Fin de Grado ha consistido en realizar una caracterización más completa a nivel físico-químico y microbiológico del producto inicial. A continuación, se mostrará la segunda parte, que consiste en los resultados del producto atomizado y liofilizados y la comparación con el producto inicial (muestra control).

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO INICIAL

En este punto se ha realizado la caracterización físico-química y microbiológica de la reconstitución de caseína micelar al 8% a tiempo cero y tras 7 días a 4°C y a 10° C para observar los cambios durante su almacenamiento.

En la Tabla 7 se indican los resultados de pH y coordenadas CIELAB.

Tabla 7. Análisis físico-químico de la reconstitución de caseína micelar al 8% (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

Temp. (°C)	Tiempo (días)	pH	L*	a*	b*	ΔE
-	0	7,06a	81,38 ± 0,07a	-2,99 ± 0,01a	-0,24 ± 0,04a	
4	7	7,05 ± 0,02a	82,26 ± 0,02a	-2,74 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a	0,98
10	7	7,01 ± 0,05a	80,95 ± 0,02a	-3,01 ± 0,01a	-0,49 ± 0,03a	0,50

Los resultados indican que el pH de la caseína reconstituida es de 7,06, similar al de la leche (6,6). Tras 7 días de almacenamiento a 4°C y 10°C, el pH no presenta diferencias significativas (p-valor > 0,05). Este pH es cercano al pH óptimo (6,7) de estabilización de las caseínas (Zimmermann-Stein & Ruiz- Espinoza, 2010).

En cuanto al color, la caseína micelar presenta una luminosidad elevada y valores a* y b* cercanos a cero. En la leche, el color blanco es el resultado de su estructura física. Las micelas de caseína y los glóbulos grasos dispersan la luz incidente y como consecuencia exhibe un valor elevado del parámetro L*. Los parámetros a* y b* en cambio están influenciados por los pigmentos naturales presentes en la leche (Langman et al., 2010).

Los valores de color cambian con el almacenamiento pero las diferencias no son significativas estadísticamente (p-valor >0,05). El cálculo ΔE, que permite determinar la diferencia de color entre dos muestras, indica que las diferencias con el control (t0) son inferiores a 1. Esta diferencia es inferior a 3, valor a partir del cual se considera que la diferencia de color es perceptible por el ojo humano (Cote, 2004).

En cuanto al desarrollo microbiológico, principalmente de bacterias mesófilas, psicrótrofas y ácido-lácticas, los resultados son indicados en la Figura 17.

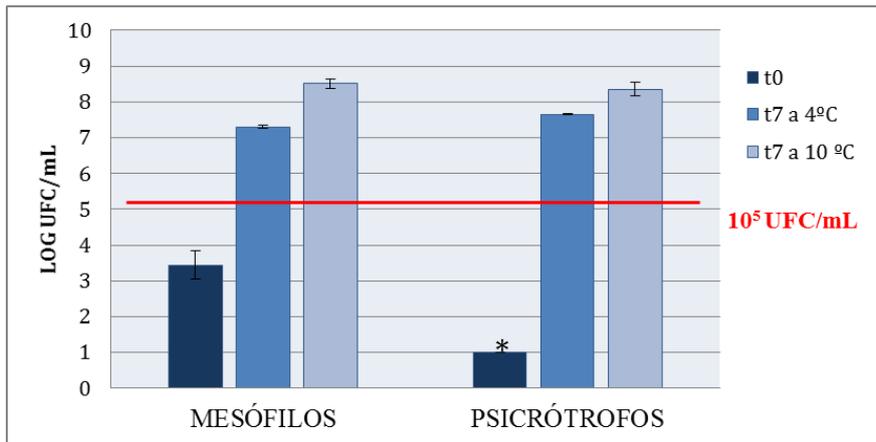


Figura 17. Desarrollo microbiano en la reconstitución micelar al 8% (* menso de 1 Log UFC/ml).

Los resultados de bacterias ácido-lácticas no se han incluido ya que el desarrollo era inferior a 10 UFC/mL. En cuanto al recuento de bacterias mesófilas, podemos observar que a tiempo 0 el número de UFC/mL están por debajo de límite legal para leche pasteurizada (10⁵ UFC/mL) según el Reglamento (CE) N° 1020/2008, pero cuando pasan 7 días conservadas tanto a 4°C como 10°C el número de UFC/mL se eleva a 10⁷ UFC/mL siendo más elevado en el caso de 10°C.

En cuanto a las bacterias psicrótrofas, la legislación no determina un límite pero se observa un desarrollo importante igualmente durante el almacenamiento.

Estos resultados indican que la caseína micelar al 8% tiene una vida útil inferior a 7 días en condiciones de refrigeración debido a un desarrollo microbiológico importante y siendo un riesgo sanitario para el ser humano. Sin embargo, el pH y el color se mantienen estables.

Por lo tanto, este Trabajo Fin de Grado propone la utilización de tratamientos de conservación como la atomización y la liofilización ya que el producto líquido presenta una vida útil corta.

4.2 EFECTO DE LA ATOMIZACIÓN Y LA LIOFILIZACIÓN SOBRE UNA CASEÍNA MICELAR CONOCIDA (Prodiet 87B)

La caseína micelar atomizada y liofilizada según las condiciones indicadas en el plan experimental, fueron analizadas en cuanto a los siguientes parámetros: aspecto, color, actividad del agua, índice de dispersión y de solubilidad, tamaño de partícula y estabilidad física analizada con el Turbiscan™.

4.2.1 Aspecto

Como se puede observar en la Figura 18, el concentrado proteico atomizado es el más blanquecino de los cuatro, teniendo los otros 3 un color más amarillento. En cuanto a la textura de los polvos, el producto inicial y el polvo atomizado presentaban una textura similar, siendo el polvo atomizado más compacto y el polvo control más suelto. Por otro lado, el polvo de ambas liofilizaciones son similares entre ellas pero presentan un aspecto más higroscópico que el producto inicial y el atomizado.



Figura 18. Concentrado proteico control, atomizado, liofilizado 1 y liofilizado 2 (de izq a drch).

4.2.2 Color

Las figuras 19, 20 y 21 indican las tres coordenadas CIELAB para la caseína micelar antes y después de atomización y liofilización con las dos condiciones (Liofilización 1, secado primario de 23 horas; Liofilización 2, secado primario de 8 horas).

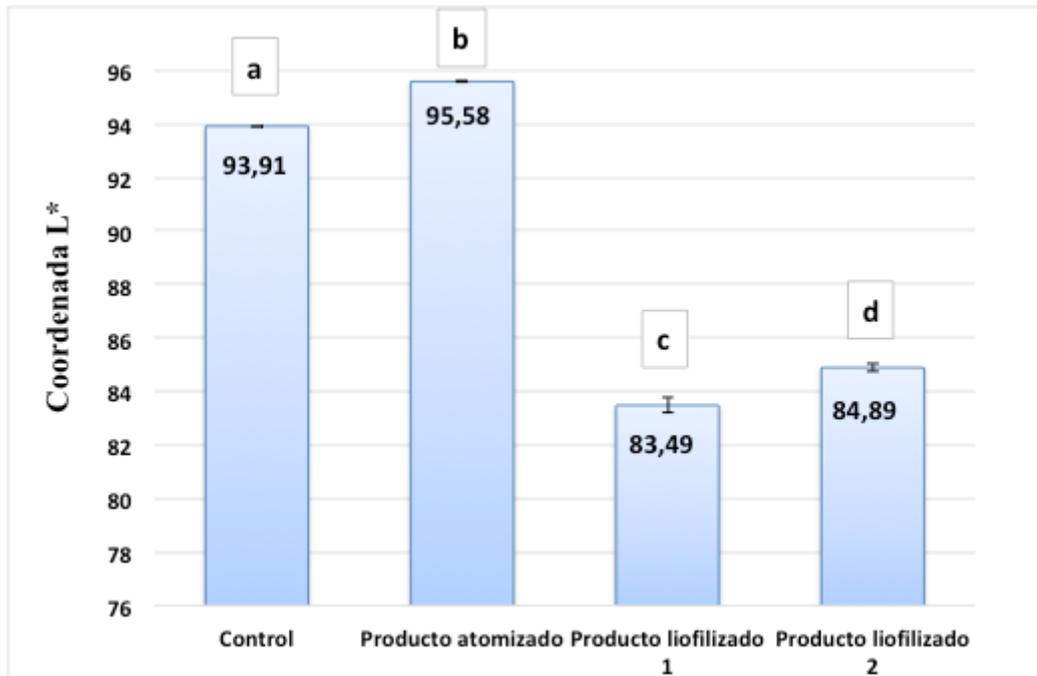


Figura 19. Coordenada L* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

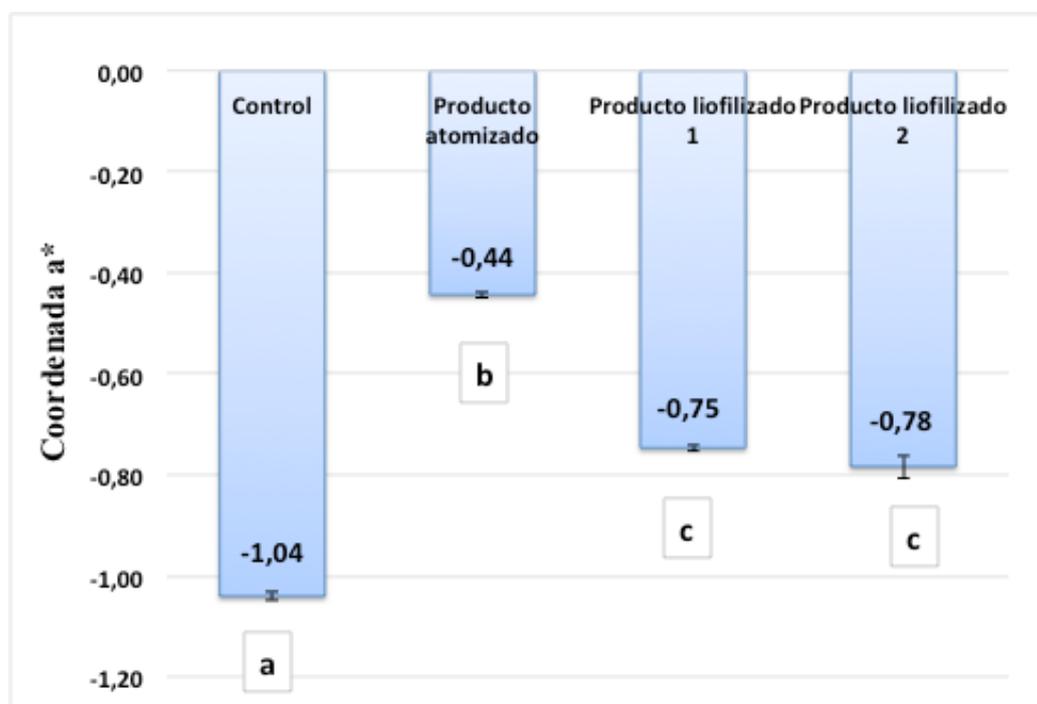


Figura 20. Coordenada a* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

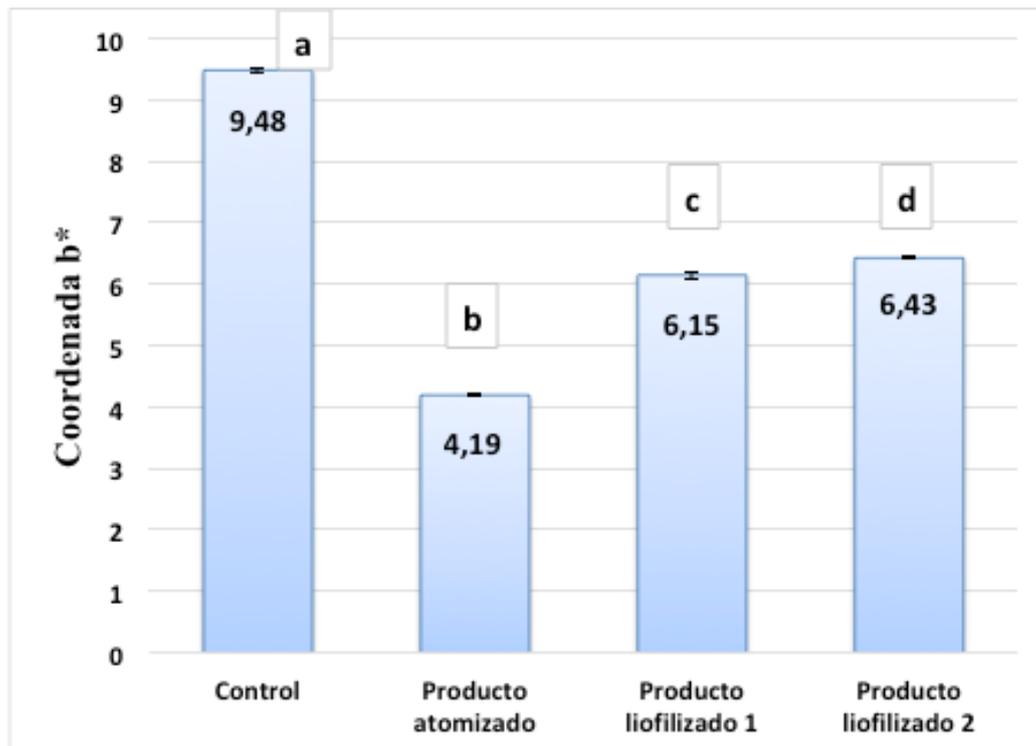


Figura 21. Coordenada b* de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

Los resultados indican que el producto atomizado presenta el mayor valor L*, es decir, la mayor luminosidad y los menores valores a* y b*, es decir, menos amarillo-verdosa, por ellos es la muestra más blanca de las cuatro, como se podía apreciar en la Figura 18. Los productos liofilizados presentan una luminosidad inferior al control (10 unidades menos) y además presentan una menor contribución de las componentes a* y b*.

El análisis estadístico determina que hay diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) entre los cuatro productos. Los valores obtenidos de ΔE , que indica las diferencias de color para las tres coordenadas con las del control, son: atomización vs control $\Delta E=5,59$; liofilización 1 vs control $\Delta E=10,95$ y liofilización 2 vs control $\Delta E=9,53$. Por lo tanto las diferencias de los ensayos con el control son visibles para el ojo humano ya que el valor ΔE es superior a 3 en los tres casos.

4.2.3 Actividad de agua

En la Figura 22 podemos ver la actividad de agua de los productos obtenidos en los tres ensayos respecto al producto inicial (Atomización; Liofilización 1, secado primario de 23 horas; Liofilización 2, secado primario de 8 horas). El valor de a_w en los alimentos puede variar de 0,0 a 1,0, siendo el valor de la leche en polvo $<0,60$ (Carrillo & Reyes, 2013). La actividad de agua es uno de los factores intrínsecos que posibilitan o dificultan el crecimiento microbiano en los alimentos.

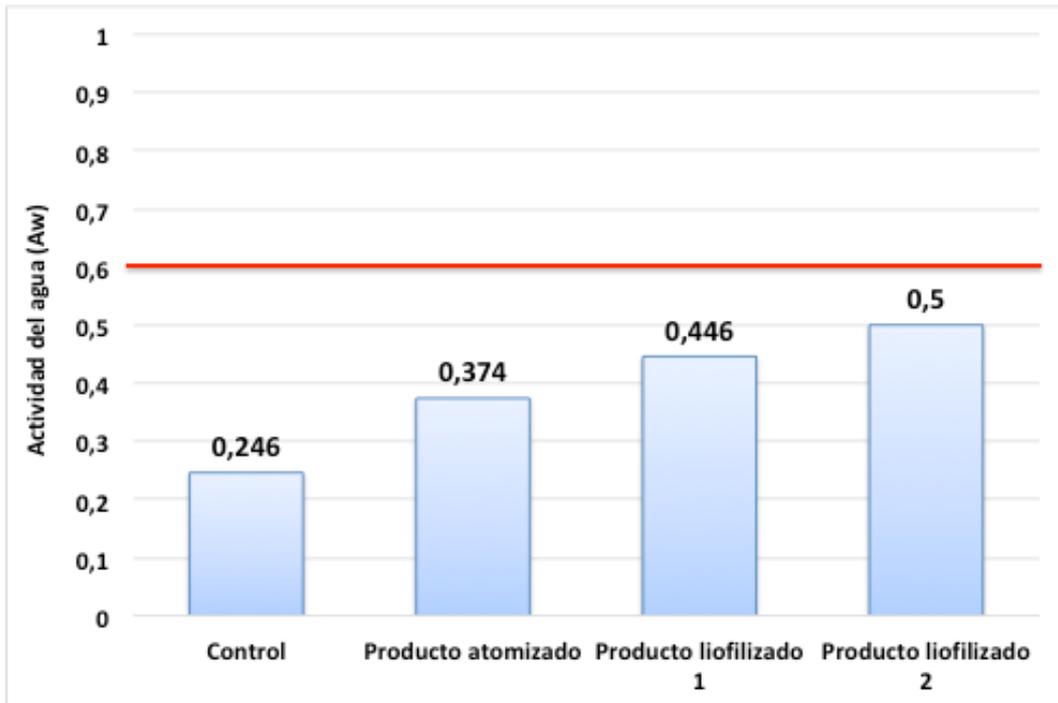


Figura 22. Actividad del agua la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2.

Las actividades del agua son inferiores a 0,5. Estas cantidades de actividad de agua se pueden deber a que el concentrado proteico (CP) del que partimos tiene una cantidad de lactosa muy baja (2%). Se sabe que la lactosa por su mayor solubilidad, hace que la actividad de agua aumente. Otro componente que también influye es la cantidad de materia grasas, en el caso del CP del que partimos también tiene muy poca cantidad de grasas (1,5%). La materia grasa manifiesta un crecimiento rápido en la actividad de agua por lo que puede ser otra razón para entender la baja actividad de agua de los productos estudiados (Stapelfeldt et al., 1997).

Los procesos de secado estudiados no han conseguido alcanzar el mismo nivel de actividad de agua que tenía el producto de partida, aunque la actividad de agua después de los ensayos está por debajo de 0,6 que se considera un límite seguro en el cual los microorganismos no se multiplican (Carrillo & Reyes, 2013).

Cuando atomizamos obtenemos una actividad de agua menor que cuando liofilizamos, varios estudios han demostrado que puede deberse a que en el proceso de atomización se alcanzan unas temperaturas mayores que hacen que se elimine mayor cantidad de agua de la caseína, dejando menos humedad, es decir, una actividad de agua menor (Darniadi, Ho, & Murray, 2017). En cuanto a los productos liofilizados, en la liofilización 2 al tratarse de un secado primario más corto (8 horas) que en el caso de la liofilización 1 (23 horas) la actividad de agua es mayor, debido a que en ese secado es donde se elimina el 75-90% del agua del producto.

4.2.4 Tamaño de partícula

La medida del tamaño de partícula (nm) fue realizada para los ensayos llevados a cabo con la reconstitución de caseína micelar al 5% durante 3 horas por el laboratorio de Área de Materiales del Centro Multidisciplinar de Tecnologías para la Industria (CEMITEC, Noáin, Navarra).

Es importante destacar que el tamaño de partícula se hace sobre la parte más soluble. Además, el tamaño de partícula depende en gran medida de la composición de la caseína micelar y de los procedimientos de pretratamiento utilizados antes del secado (Balde & Aïder, 2017).

Los resultados indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos como muestra el análisis estadístico (p-valor < 0,05).

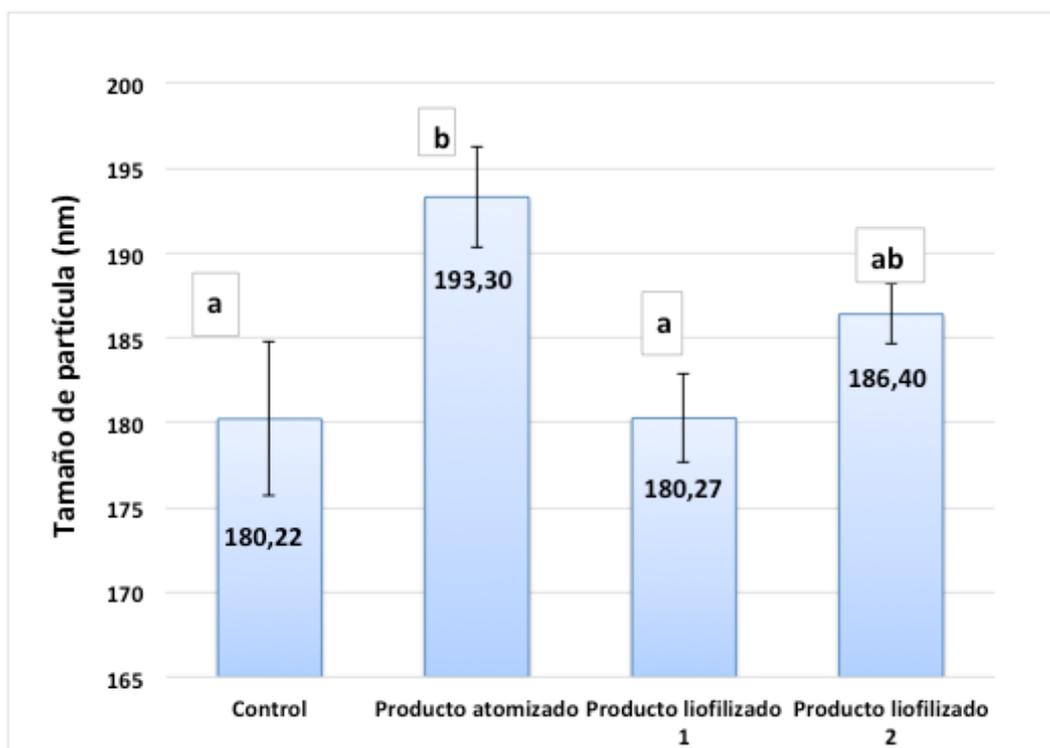


Figura 23. Tamaño de partícula de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

El producto inicial presenta un tamaño de partícula entre 180 y 185 nm. Los productos liofilizados, pese a las diferencias de tiempo de secado primario, presentan resultados similares por lo que este proceso no modifica en gran medida el tamaño de partícula inicial de las caseínas. Por otro lado, el producto atomizado presenta el mayor valor de tamaño de partícula, probablemente porque se habrán formado agregados entre las partículas..

Las partículas mayores de $\geq 250 \mu\text{m}$ serían demasiado grandes para permanecer dispersas y sedimentarían rápidamente, es decir, dejarían de ser solubles en el tiempo. En cambio partículas de tamaño más pequeño (que contienen agregados de micelas de caseína) podrían dispersarse mejor y obtener una mejor solubilidad (Lu et al., 2015). Para todos los tratamientos estudiados, tras la reconstitución las muestras se mantendrán estables a lo largo del tiempo ya que presentan valores de tamaño de partícula menores a $250 \mu\text{m}$ (atomización = $193,30\text{nm}$; liofilización 1 = $180,27$; liofilización 2 = $186,40$).

En cuanto a la polidispersión (variabilidad de las partículas) el p-valor es mayor que $0,05$, por lo que ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo con un 95% de nivel de confianza. Esto significa que la variabilidad del tamaño de partículas en cada uno de los tratamientos es muy similar.

4.2.5 Índice de dispersión

Las propiedades de un producto en polvo van afectar al grado de instantaneidad, es decir, a su capacidad de reconstituirse casi de inmediato en un medio líquido. Para que un polvo exhiba buenas características de reconstitución, es necesario un equilibrio apropiado de las diferentes fases de hidratación, explicadas en el apartado 1.5 Rehidratación de los polvos lácteos.

En los estudios de leche en polvo se utiliza el término dispersabilidad para referirse a la capacidad de las partículas de reducirse lo suficiente en tamaño para pasar a través de un tamiz de malla de $200\text{-}250 \mu\text{m}$ (Westergaard, 2004).

En la Figura 24 se muestran los resultados de dispersión obtenidos en las cuatro muestras.

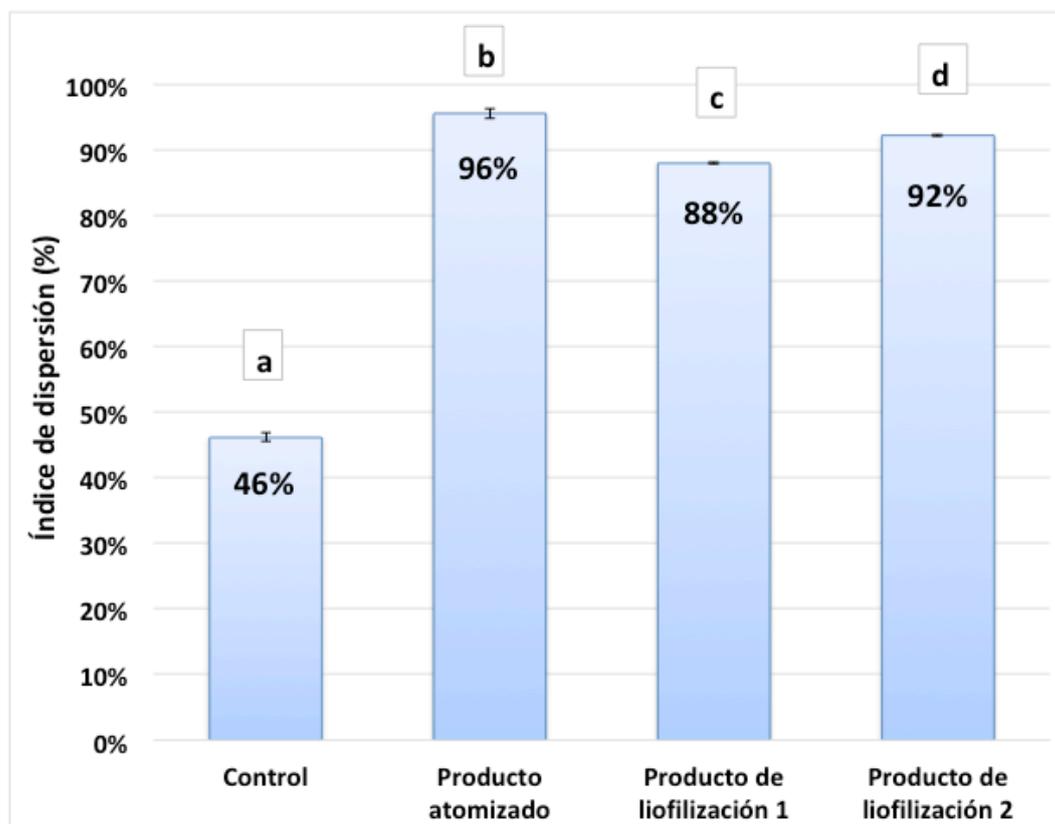


Figura 24. Índice de dispersión de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

Los resultados indican que la muestra control presenta el menor índice de dispersión de las cuatro y esta diferencia es significativa a nivel estadístico (nivel de significación del 95%). Por lo que se puede afirmar que los tratamientos de secado, atomización y liofilización aplicados, en este caso aumentan considerablemente la dispersabilidad del concentrado proteico lácteo, ya que pasamos de un valor entorno al 50% a valores de superiores al 88%. Esto puede ser debido a que la dispersión de las micelas de caseína en la leche es bastante estable y resistente a operaciones de concentración, congelación, secado y reconstitución.

Los tratamientos aplicados también presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas (p -valor $<0,05$). La atomización es el tratamiento que mayor dispersabilidad muestra con casi un 100%, esto puede deberse al menor contenido de humedad del producto atomizado respecto con las muestras liofilizadas, datos que se muestran en la Figura 22. También puede deberse al tamaño de partícula, ya que un tamaño de partícula mayor, incrementa la dispersabilidad. (Balde & Aïder, 2017). Por otro lado, las liofilizaciones 1 y 2 también obtienen altos valores de dispersabilidad 88% y 92%, respectivamente.

4.2.6 Índice de solubilidad

En cuanto a la solubilidad, que se define como la velocidad y grado en que los componentes de las partículas de polvo se disuelven en el agua, los resultados se muestran en la Figura 25.

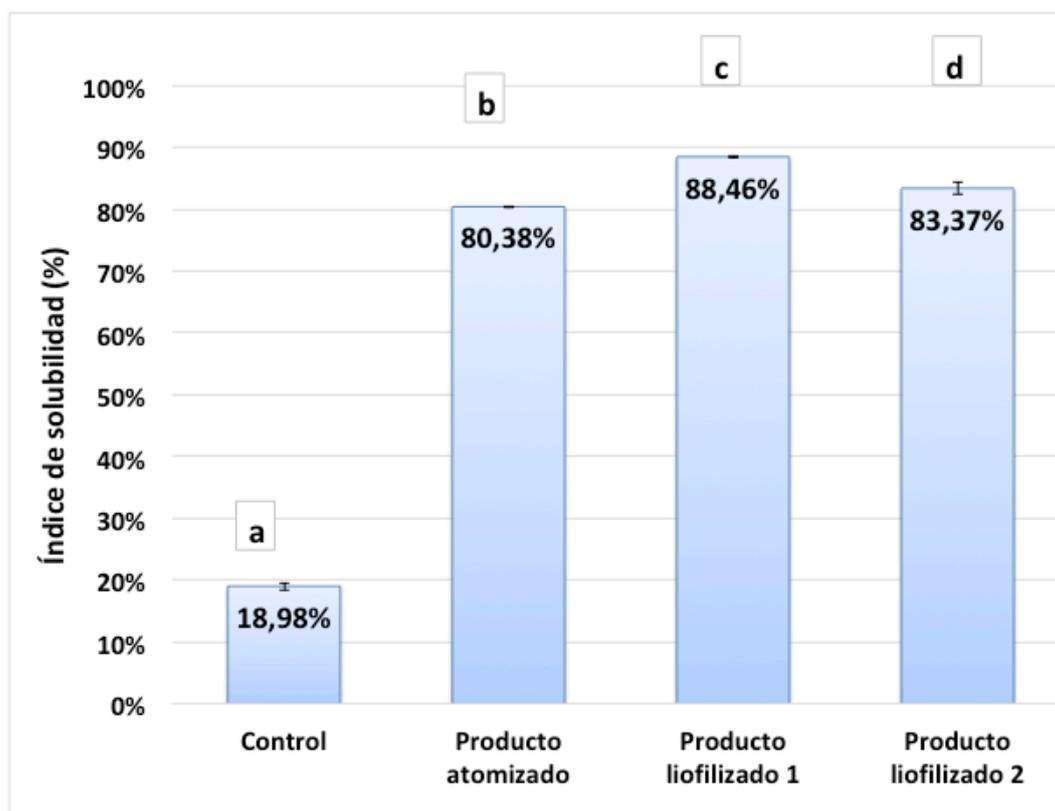


Figura 25. Índice de solubilidad de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización ensayo 1 y 2 (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%).

Todos los tratamientos realizados mejoran la solubilidad del producto original de manera importante, debido a que pasamos de una solubilidad del 20% en el control a una solubilidad por encima del 80% en los tres casos. Esto mismo ocurriría con el índice de dispersión por lo que los productos presentan una buena instantaneidad después de los tratamientos de atomización y liofilización realizados. Estas diferencias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$).

En este caso el producto atomizado, muestra una solubilidad menor que los productos liofilizados. La presencia de materia insoluble no se debe a la desnaturalización térmica o modificación bioquímica, sino de una disminución en la velocidad de transferencia del agua de reconstitución reconstituida. Esta disminución en la velocidad puede deberse al mayor tamaño de partícula que presenta el producto atomizado. En cuanto a los productos liofilizados el que mayor índice de dispersión tienes es la liofilización con un secado primario de 23 horas.

Observando el índice de dispersión y el de solubilidad simultáneamente, se puede ver que la aplicación del secado por atomización y el secado por liofilización en ambas condiciones, mejoran de manera importante la reconstitución de un concentrado proteico lácteo, obteniendo valores por encima del 80% en todos los casos. En cuanto a los tratamientos, existe una compensación entre los tres tratamiento. Lo que se observa con estos resultado, es que tanto con la atomización como con las dos liofilizaciones, se cumple lo comentado al principio de este capítulo, es decir, para que un polvo exhiba buenas características de reconstitución, es necesario un equilibrio apropiado de las diferentes fases de hidratación, y en los tres tratamientos se da ese equilibrio y esa compensación entre dispersión y solubilidad.

En general, los factores que aumentan la humectabilidad y la dispersabilidad son la hidrofiliidad, el área de superficie específica, la porosidad, el tamaño de partícula más grande y los ángulos de contacto partículas / agua más pequeños (Balde & Aider, 2017). Es por ello que los productos que mayor tamaño de partícula muestran, es decir, el atomizado y el de la liofilización 2 son los productos que mayor índice de dispersión muestran.

4.2.7 Estabilidad física

Podemos definir la estabilidad física como la conservación de las propiedades físicas del producto incluyendo la apariencia, uniformidad, disolución y propiedades organolépticas durante un tiempo determinado. Dicha estabilidad física se determinó con Turbiscan LABTM FORMULATION SMART (Formulation, Francia), equipo empleado para el análisis de caracterización de dispersiones concentradas. El análisis se hizo cada cinco minutos durante dos horas.

El aparato realiza medidas en toda la largura del recipiente cada cierto tiempo (5 min). Con este tipo de análisis, se pueden observar fenómenos de sedimentación, cremado, floculación, agregación y/o coalescencia. Los resultados se representan en las Figuras 26 y 27 . A la hora de interpretar los gráficos es necesario enfocarse en la señal correcta, transmisión (ΔT) o retrodispersión (ΔBS). En este caso la señal será la retrodispersión ya la caseína concentrada es una muestra opaca. En siguiente tabla se muestras las posibles desestabilizaciones.

Tabla 8. Tipos de desestabilización física.

Baja	Media	Alta	Fenómeno
$\Delta BS \uparrow$	-	$\Delta BS \downarrow$	Sedimentación
$\Delta BS \downarrow$	-	$\Delta BS \uparrow$	Cremación
-	$\Delta BS \uparrow \text{ ó } \downarrow$	-	Floculación

En la Figura 26 se puede ver una ligera desestabilización física, ya que en la parte baja la retrodispersión aumentan y en la parte alta la retrodispersión disminuye, por lo que el fenómeno de desestabilización de la muestra control se debe a una ligera sedimentación de las partículas.

En cuanto a la caseína micelar liofilizada con un secado primario de 8 horas (Figura 27), muestra un gráfico de retrodispersión más estable que la muestra inicial.

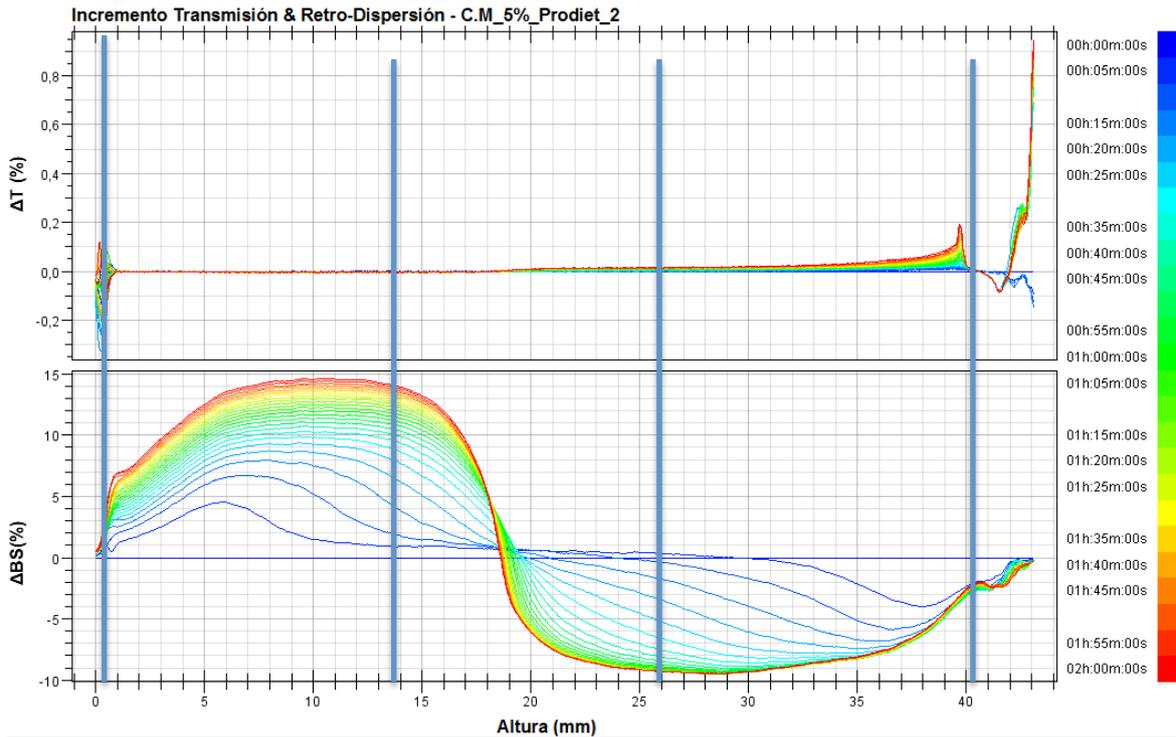


Figura 26. Incremento de la transmisión (ΔT) y de retrodispersión (ABS) del producto inicial.

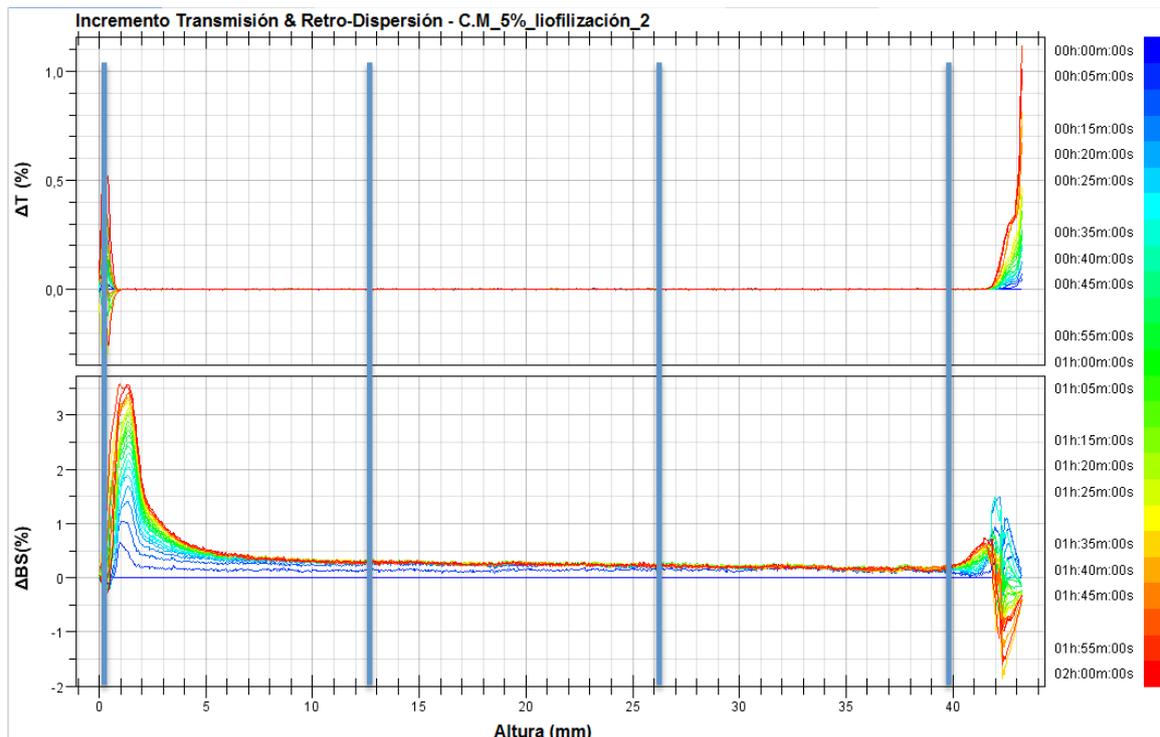


Figura 27. Gráfico de la estabilidad física del producto de liofilización 2.

El programa de TurbiscanTM permite calcular el valor TSI que es la modificación de la retrodispersión en función del tiempo. El programa permite también ver la modificación en zonas diferentes de la muestra: parte baja (0-13mm), parte media (13-26mm) y parte alta (23-40mm).

Como se puede ver la Figura 28 se divide en tres gráficos que hacen referencia a la parte baja, media y alta del recipiente. En primer lugar vemos que ocurre lo mismo en las tres partes ya que en los tres gráficos se aprecia la disminución del TSI (índice de estabilidad Turbiscan). La muestra con mayor TSI es la muestra control y por lo tanto es la muestra más inestable, debido a que cuanto mayor es el valor del TSI mayor es la inestabilidad. La aplicación de las técnicas de secado, es decir, la atomización, la liofilización (23h) y la liofilización (8h), reduce en gran medida el TSI y por lo tanto mejora la estabilidad física del concentrado proteico.

Entre los tres tratamientos, el producto atomizado presenta una mayor inestabilidad física en comparación con los productos liofilizados, eso puede deberse a la agregación de la que hablábamos en el tamaño de partícula.

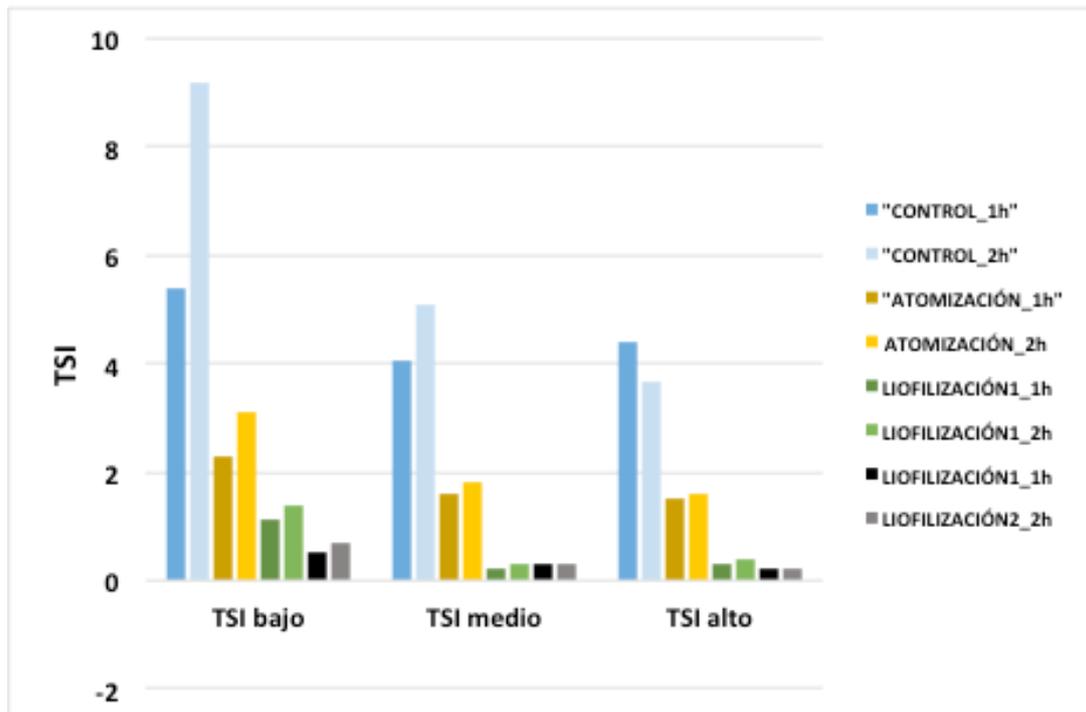


Figura 28. Estabilidad física de la caseína micelar inicial y después de la atomización, liofilización 1 y liofilización 2.

5. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en este presente Trabajo Fin de Grado se obtienen las siguientes conclusiones:

1. Las técnicas de secado estudiadas dan lugar a un producto de color similar al de la leche.
2. Los productos obtenidos por liofilización presentan un aspecto algodonoso y granulado que difiere con el aspecto normalmente buscado en productos en polvo, mientras que el producto atomizado presenta un aspecto de polvo compacto.
3. Tanto el producto atomizado como los productos liofilizados presentan una a_w inferior a 0,6 por lo que no hay riesgo sanitario.
4. El tamaño de partícula, no es modificada tras la liofilización y en el caso de la atomización, hay un fenómeno de agregación..
5. Con la atomización y la liofilización, el índice de dispersión y de solubilidad mejoran de manera pronunciada la reconstitución de un concentrado proteico lácteo, obteniendo valores por encima del 80% en todos los casos.
6. La estabilidad física es mejorada en el caso de los tres tratamientos ya que en los tres casos se reduce el TSI.
7. No existen grandes diferencias entre la atomización, la liofilización de 23 horas de secado y la liofilización de 8 horas de secado, en lo que a análisis de reconstitución de un concentrado proteico lácteo se refiere.

6. PERSPECTIVAS

Atendiendo a los resultados de este trabajo, podemos plantear los siguientes pasos a seguir:

- El secado por atomización es industrialmente el método preferido para producir polvos de proteínas alimentarias. Esto se debe a que el secado por atomización requiere un menor costo de capital (<8 veces) y un costo operativo (<5 veces) en comparación con el secado por liofilización, ya que la liofilización presenta alto coste de la instalación y los equipos, gasto energético, operación de larga duración. Por lo que se debería estudiar en detalle la atomización, en cuanto a la influencia de la temperatura de entrada del producto y su influencia en el rendimiento y en las características finales.
- La liofilización parece impactar menos en las características físico-químicas del producto pero debido al alto coste sería interesante si el fin es la conservación fuera un principio activo.
- Otro punto a estudiar sería el efecto de la temperatura y de la humedad durante la conservación del polvo obtenido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aalaei, K., Rayner, M., & Sjöholm, I. (2016). Storage stability of freeze-dried, spray-dried and drum-dried skim milk powders evaluated by available lysine. *LWT*, 73, 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.011>
- Agarwal, S., Beausire, R. L. W., Patel, S., & Patel, H. (2015). Innovative Uses of Milk Protein Concentrates in Product Development. *Journal of Food Science*, 80(S1), A23-A29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12807>
- Alvarado, J. (2014). *Principios de Ingeniería Aplicados en Alimentos (2da. ed.)*.
- Araneda, M. (2018). Leche y derivados: Composición y Propiedades. Recuperado 1 de junio de 2018, a partir de <http://www.edualimentaria.com/leche-y-derivados-composicion-y-propiedades>
- Balde, A., & Aïder, M. (2017). Effect of cryoconcentration, reverse osmosis and vacuum evaporation as concentration step of skim milk prior to drying on the powder properties. *Powder Technology*, 319, 463-471. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.016>
- Birchal, V. S., Passos, M. L., Wildhagen, G. R. S., & Mujumdar, A. S. (2005). Effect of Spray-Dryer Operating Variables on the Whole Milk Powder Quality. *Drying Technology*, 23(3), 611-636. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054153>
- Calvo, M. (s. f.). CASEINAS. Recuperado 1 de junio de 2018, a partir de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/caseina.html>
- Carrillo, M. L., & Reyes, A. (2013, enero). Vida útil de los alimentos. Recuperado a partir de <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Tiie9mJS0n0J:https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5063620.pdf+&cd=8&hl=es&ct=clnk&gl=es&client=safari>
- Cote, C. (2004). Guía de Uso de MonacoOPTIX, 106.
- Crowley, S. , Kelly, A. L., Schuck, P., Jeantet, R., & O'Mahony, J. A. (2016). Rehydration and Solubility Characteristics of High-Protein Dairy Powders. En *Advanced dairy chemistry*.
- Darniadi, S., Ho, P., & Murray, B. S. (2017). Comparison of blueberry powder produced via foam-mat freeze-drying versus spray-drying: evaluation of foam and powder properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 2002-2010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8685>
- Dickinson, E., & Parkinson, E. L. (2004). Heat-induced aggregation of milk protein-stabilized emulsions: sensitivity to processing and composition. *International Dairy Journal*, 14(7), 635-645. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.12.005>
- Edwards, P. B., Creamer, L. K., & Jameson, G. B. (2008). Chapter 6 - Structure and stability of whey proteins. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 163-203). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00006-4>
- Eshpari, H., Tong, P. S., & Corredig, M. (2014). Changes in the physical properties, solubility, and heat stability of milk protein concentrates prepared from partially acidified milk. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7394-7401. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8609>
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M. B., & Laencina, J. (2006). MODELOS ESTRUCTURALES DE LA MICELA DE CASEÍNA, 14.
- Fox. (2008). Chapter 1 - Milk: an overview. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 1-54). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00001-5>

- Fox, P. F. (2003). Milk Proteins: General and Historical Aspects. En *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 1-48). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_1
- Fox, Patrick F., & McSweeney, P. L. H. (2013). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B*. Springer.
- Gapper, L. W., Copestake, D. E. J., Otter, D. E., & Indyk, H. E. (2007). Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 93-109. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1391-z>
- Gazi, I., & Huppertz, T. (2015). Influence of protein content and storage conditions on the solubility of caseins and whey proteins in milk protein concentrates. *International Dairy Journal*, 46, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.009>
- Havea, P. (2006). Protein interactions in milk protein concentrate powders. *International Dairy Journal*, 16(5), 415-422. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.005>
- Hernández-Rojas, M. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales, 10.
- Horne, D. S. (2008). Chapter 5 - Casein micelle structure and stability. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 133-162). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00005-2>
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2018). The caseins: Structure, stability, and functionality. En *Proteins in Food Processing* (pp. 49-92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
- Jenness, R., & Holt, C. (1987). Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. *Experientia*, 43(9), 1015-1018. <https://doi.org/10.1007/BF01952224>
- Keshani, S., Daud, W. R. W., Nourouzi, M. M., Namvar, F., & Ghasemi, M. (2015). Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering*, 146, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.004>
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2018). Whey proteins. En *Proteins in Food Processing* (pp. 93-126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
- Langman, I., Rosetti, L., Sancho, A. M., Comeron, E., Descalzo, A., & Grigioni, G. (2010). Características de color de leches de vacas alimentadas con alfalfa y silo de maíz.
- Lu, Y., McMahon, D. J., Metzger, L. E., Kommineni, A., & Vollmer, A. H. (2015). Solubilization of rehydrated frozen highly concentrated micellar casein for use in liquid food applications. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5917-5930. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9482>
- Mitchell, J., Irons, L., & Palmer, G. J. (1970). A study of the spread and adsorbed films of milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200(1), 138-150.
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 52(4), 159-168. <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>
- Orrego Alzate, C. E. (2003). *Procesamiento de alimentos*. Univ. Nacional de Colombia.
- Orrego Alzate, C. E. (2008). *Congelacion y liofilizacion de alimentos*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.

- Pascualetti, G., Romano, R., García, L., & Manzano, H. (s. f.). Diferenciación Varietal por Medio del Espacio CIELab simplificado de vinos tintos monovarietales, 7.
- Ramírez-Navas, J. (2007). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*, 6, 1-39.
- Ranadheera, C. S., Liyanaarachchi, W. S., Chandrapala, J., Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2016). Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.005>
- Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. L. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos Microencapsulation of bioactive compounds, 8.
- Sapper, M., Martínez-Navarrete, N., & Camacho, M. M. (2015). MEDIDA DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE PRODUCTOS DE FRUTA EN POLVO, 19.
- Schuck, P., Piot, M., Méjean, S., Le Graet, Y., Fauquant, J., Brulé, G., & Maubois, J. L. (1994). Déshydratation par atomisation de phosphocaseinate natif obtenu par microfiltration sur membrane. *Le Lait*, 74(5), 375-388. <https://doi.org/10.1051/lait:1994531>
- Schuck, Pierre. (2008). Chapter 9 - Effects of drying on milk proteins. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 283-305). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00009-X>
- Schuck, Pierre, le Floch-Fouere, C., & Jeantet, R. (2013). Changes in Functional Properties of Milk Protein Powders: Effects of Vacuum Concentration and Drying. *Drying Technology*, 31(13-14), 1578-1591. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.816316>
- Shittu, T. A., & Lawal, M. O. (2007). Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chemistry*, 100(1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.013>
- Stapelfeldt, H., Nielsen, B. R., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of Heat treatment, Water Activity and Storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder (Vol. Int. Dairy Journal 7, pp. 331-339).
- Thompson, A., Boland, M., & Singh, H. (Eds.). (2009). *Milk proteins: from expression to food*. London: Academic.
- Vega-Mercado, H., Marcela Góngora-Nieto, M., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 271-289. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00224-7)
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2017). Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 985-994. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.087>
- Yada, R. Y. (2004). *Proteins in Food Processing*. Elsevier.
- Zimmermann-Stein, K., & Ruiz- Espinoza, H. (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos.

PRODIET 87 B

Re f. MPI87BDS09

TECHNICAL DATA SHEET

Description PRODIET87 B is a milk protein isolate (MPI) in spray-dried powder that contains more than 87% protein on dry matter.
PRODIET87 B is rich in micellar caseins: 92% as compared to 80% in original milk.

Applications PRODIET87 B is perfectly adapted to functional foods (bars, beverages...).
PRODIET87 B also offers good heat stability.

Benefits PRODIET87 B is rich in high nutritional quality proteins and rich in micellar caseins which have a positive effect on satiety.
PRODIET87 B is thus particularly adapted to the market of sports, dietetic and clinical nutrition.

Technical specifications

Packaging and storage

Physical-Sensorial	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Form	Free flowing powder		Internal method
Color	Creamy white		Internal method
Taste and odor	Milky		Internal method
Scorched particles	A	B	ADMI
Bulk density			ISO 8967

Packaging:
20kg bag

Best before date:
18 months when stored in a cool and dry place.

Quality assurance

Additives: Free
Allergens: Milk and products thereof
BSE: Free
Contaminants: Comply with EC regulation
GMO: Free

Regulation

Customs code (EC): 35.04.00.10.00
Suggested labelling: Milk protein isolate (MPI)

Mar. 18, 2016

Chemical

	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Total moisture	5.0 %	≤ 6.0 %	IDF 26
Total protein	83.0 %		ISO 8968
Protein on dry matter	87.5 %	≥ 87.0 %	ISO 8968
Total fat	1.5 %	≤ 2.5 %	ISO 1736
Total carbohydrate	2.0 %		by difference
(of which) Sugars	2.0 %		by difference
Lactose	2 %		by difference
Total ash	8.5 %	≤ 9.0 %	V04-208

Microbiological

	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Total Plate Count	5 000 CFU / g	< 10 000 CFU / g	ISO 4833
Yeasts - Moulds	< 10 CFU / g	< 30 CFU / g	ISO 6611
Enterobacteriaceae	Negative / g	Negative / g	ISO 8523
Coliform organisms	Negative / g	Negative / g	ISO 4831
E. coli	Negative / g	Negative / g	ISO 7251
Salmonella	Negative / 50 g	Negative / 50 g	ISO 6579
Staphylococcus coag. +	Negative / g	Negative / g	ISO 6888

Nutritional

Energy per 100g 354 kcal - 1501 kJ

In the absence of an agreed specification, this technical data sheet would be held valid for delivery.